

ISTITUTO D' IGIENE DELLA R. UNIVERSITÀ DI SASSARI

PROF. CLAUDIO FERMI

coadiuvato dallo studente E. BASSU

Studio sull' Anaerobiosi.

Estratto

dall' Archivio di Farmacologia sperimentale e Scienze affini

Anno IV. - Vol. IV. - Fasc. 7-8, 9, 10-11.

DIRETTORI

Domenico Lo Monaco

PROFESSORE DI CHIMICA FISIOLÓGICA
NELLA R. UNIVERSITÀ DI ROMA

Manfredi Albanese

PROF. DI FARMACOLOGIA SPERIMENTALE
NELLA R. UNIVERSITÀ DI PAVIA

Ufficio di Redazione ed Amministrazione

Via Depretis, 92, Roma



SIENA

1167 — STABILIMENTO TIPOGRAFICO CARLO NAVA — 1167

—
1905.

ISTITUTO D' IGIENE DELLA R. UNIVERSITÀ DI SASSARI

PROF. CLAUDIO FERMI

coadiuvato dallo studente E. BASSU

Studio sull' Anaerobiosi.

Estratto

dall' Archivio di Farmacologia sperimentale e Scienze affini

Anno IV. - Vol. IV. - Fasc. VII-VIII.

DIRETTORI

Domenico Lo Monaco

PROFESSORE DI CHIMICA FISIOLÓGICA
NELLA R. UNIVERSITÀ DI ROMA

Manfredi Albanese

PROF. DI FARMACOLOGIA SPERIMENTALE
NELLA R. UNIVERSITÀ DI PAVIA

Ufficio di Redazione ed Amministrazione

Via Depretis, 92, Roma



SIENA

1167 — STABILIMENTO TIPOGRAFICO CARLO NAVA — 1167

—
1905.

PROF. CLAUDIO FERMI

coadiuvato dallo studente E. BASSU

Studio sull' Anaerobiosi.

PROSPETTO DEL LAVORO.

- I. Introduzione e scopo del lavoro.
- II. Metodi anaerobici conosciuti e loro critica sperimentale.

Esiste nessuno fra i noti metodi di anaerobiosi in cui non sia dimostrabile l'ossigeno libero?

Nuovi metodi e nuovi processi di anaerobiosi.
- III. Metodo 1° - Espulsione dell' O_2 dal substrato mediante l'ebollizione coadiuvata da uno strato protettivo di paraffina funzionante a mò di valvola.

RICERCHE PRELIMINARI:

 - a) Allontanamento dell' O_2 mediante l'ebollizione dai vari substrati.
 - b) Efficacia di varie sostanze impermeabili all'aria da sovrapporsi al substrato per proteggerlo durante e dopo l'ebollizione.
- IV. Metodo 2° - Espulsione dell' O_2 mediante l'ebollizione coadiuvata da uno strato di paraffina, da uno strato di pirogallato potassico e da un secondo strato di paraffina solida con susseguente sommersione della provetta nell'olio di paraffina o di oliva.

RICERCHE PRELIMINARI:

 - a) Efficacia del capovolgere le culture direttamente nel pirogallato potassico funzionante ad un tempo come mezzo assorbente dell' O_2 e protettivo contro l'entrata di O_2 dall'esterno.
 - b) Influenza della chiusura ermetica dei recipienti contenenti le culture capovolte nel pirogallato potassico.
- V. Metodo 3° - Culture a strisciamento in capsule e ad infissione in tubi capovolte nel pirogallato potassico.
- VI. Metodo 4° - Ebollizione del substrato coadiuvata dal solito strato di paraffina; innesto in corrente di CO_2 ; pirogallato potassico fuori del substrato.
- VII. Metodo 5° - a) RICERCHE PRELIMINARI:

Preparazione del cloruro cromoso secondo il metodo di Recoura. Attività di questo preparato e del cloruro cromoso sublimato e dell'acetato cromoso.

 - b) Esperienze istituite col cloruro cromoso.

- VIII. *Metodo 6°* - Potere riducente del fosforo, espulsione dell'aria mediante l'ebollizione ed una corrente di CO_2 , assorbimento dell' O_2 mediante il fosforo ed il pirogallato potassico.
 - IX. *Metodo 7°* - Potere fissatore dei blastomiceti.
 - X. *Metodo 8°* - Espulsione dell'aria mediante una corrente pura di CO_2 — Fissazione dell' O_2 residuale mediante il rame rovente — Vuoto mediante pompa a mercurio.
 - XI. *Metodo 9°* - Potere riducente del pirogallato potassico mescolato al substrato.
 - XII. Sviluppo degli anaerobi in superficie.
 - XIII. Sviluppo degli anaerobi coltivati secondo i nuovi metodi combinati fra loro.
 - XIV. Riassunto dei risultati.
 - XV. Considerazioni finali.
-

I. — Introduzione e scopo del lavoro.

Il PASTEUR (1) dopo le sue classiche ricerche sul modo di comportarsi dei blastomiceti e dei bacteri verso l'ossigeno, distinse biologicamente due classi di microrganismi:

Gli *Aerobi*, che per vivere hanno bisogno di ossigeno;

Gli *Anaerobi*, che ne possono far di meno.

La scoperta dell'esistenza di questi esseri che possono vivere senza ossigeno, ha suscitato infinite discussioni e molte ricerche sono state fatte a controllo di essa; ma poi la classificazione del PASTEUR fu accettata come una verità.

Il LIBORNIS soltanto la modificò dividendo i microrganismi in *Aerobi obbligati*, *Anaerobi obbligati* ed in *facoltativi* ed il FERMI propose la divisione di *ossigenofili*, *ossigenofobi* e *paraossigenofobi*.

È noto quanto siano grandi le difficoltà che si incontrano per ottenere l'assenza completa dell'ossigeno da recipienti, da substrati liquidi e solidi. Basta ricordare che l'ossigeno aderisce sì fortemente al vetro che soltanto ne viene scacciato da altissime temperature (300-400° C).

(1) PASTEUR, *Sur les animalules infusoires vivant sans oxygène libre et determinants des fermentations*. Compt. rend. de l'Acad. et sc. de Paris, T. LII, 1861.

Se si pensa che queste difficoltà aumentano nelle ricerche batteriologiche, nelle quali vanno lasciati indietro quei mezzi fisici e chimici, che potrebbero impedire già da per sè stessi lo sviluppo dei microrganismi, indipendentemente dall'assenza di ossigeno, e se si pensa al gran numero dei metodi escogitati dai singoli autori per raggiungere una anaerobiosi rigorosa, è facile comprendere quanto sia relativo il valore delle classificazioni accennate.

Del resto gli anaerobi assoluti si sviluppano talora anche se coltivati aerobicamente.

Infatti il KEDROWSKY ottenne lo sviluppo di anaerobi assoluti anche in presenza di ossigeno. Ciò riuscì pure al KITT per il *b*, del carbonchio sintomatico e al BRAATZ (1), a BELFONTE e PESCAROLO (2) per il *b* del tetano.

SANCHEZ, TOLEDO e VEILLON (3) osservarono pure che nelle vecchie colture ad alto strato alla *Liborius*, il *b* del tetano si sviluppa anche sulla superficie libera del terreno di coltura.

Più tardi anche VAILLARD e VINCENT (4) studiando l'azione degli agenti fisici sul *b* del tetano, videro che per crescere questo non ha bisogno della totale eliminazione dell'ossigeno.

Il GRIXONI afferma d'aver isolato il *b* del tetano allo stato aerobico, FERRAN ha pure osservato che il *b* del tetano ritenuto anaerobio obbligato, può aversi allo stato aerobico.

SANFELICE e VALAGUSSA (5) confermarono pure questo fatto.

BEYERINCK (5) trovò che il granulo bacterium butylicum si sviluppa in presenza quanto in assenza di ossigeno, anzi in presenza di tracce di ossigeno si svilupperebbe meglio.

(1) Centralblatt f. Bact. V. 17, pag. 168.

(2) Giornale della R. Accademia Medica di Torino, Maggio 1898.

(3) Arch. med. exper., pag. 709, 1890.

(4) Ann. d'igiene sperimentale della Regia Università di Roma, Vol. 8, pag. 406.

(5) Archives Neerlandais, I. II., Ser. 2^a, 1899, pag. 397.

TAROZZI (1) infine coltiva gli anaerobi aerobicamente in tubi di brodo contenenti pezzetti di organi animali.

* *

Il fenomeno interessante dal punto di vista del metabolismo anaerobico, che ci offre questo gruppo di batteri, i quali non solo non sono capaci di vivere in assenza di ossigeno, ma possono morire in ambiente che ne contenga; come quello di altri batteri, per esempio il vibrio del colera che pur essendo avidi di ossigeno sono capaci di riprodursi rigogliosamente nell'intestino ci spinse ad istituire alcune ricerche in proposito.

Il principale obbietto di queste ricerche fu di trovare metodi di anaerobiosi molto più perfetti dei sin qui descritti allo scopo di migliorare non tanto la tecnica delle colture anaerobiche, la quale è sufficiente, almeno per l'isolamento e la coltura di tutti gli anaerobi conosciuti, ma sibbene per poter studiare i tre seguenti problemi:

1. Se esistano microrganismi che si possano sviluppare tanto in assenza, quanto in presenza di ossigeno; cioè se esistano dei veri anaerobi facoltativi;

2. Se esistano microrganismi che non possano assolutamente svilupparsi in presenza di ossigeno; cioè se esistano veri anaerobi obbligati;

3. Se esistano microrganismi che possano svilupparsi in assenza completa di ossigeno libero; cioè *se sia possibile la vita in completa assenza di ossigeno*.

Abbiamo perciò nella prima parte del presente lavoro istituita una serie di esperienze di controllo ai vari metodi di colture anaerobiche conosciuti, e sulle basi di un esame critico-sperimentale, abbiamo nella seconda parte escogitati parecchi metodi e processi nuovi.

Metodi anaerobici conosciuti e loro critica.

Esiste nessuno fra i noti metodi di anaerobiosi in cui non sia dimostrabile l'ossigeno libero?

(1) Rif. Med. W. 5-6 8-9, 1905.

In questa prima parte del nostro lavoro abbiamo preso in esame soltanto i metodi più rigorosi, trascurando quelli nei quali era superfluo dimostrare la presenza di ossigeno nelle colture, come per esempio in quello delle *uova*, nelle quali l'ossigeno esiste naturalmente, ed in quello *del vuoto per mezzo della pompa*, poichè questa lascia sempre aria residuale.

I vari metodi di colture anaerobiche fin' ora usati si possono raggruppare nel modo seguente:

- I. *Substrati che contengono naturalmente poco ossigeno*: le uova (HUEPPE);
- II. *Eliminazione dell'ossigeno mediante la pompa a mercurio*: (GRUBER, CHAUVEAU);
- III. *Allontanamento dell'ossigeno con l'ebollizione*: (LIBORIUS);
- IV. *Allontanamento dell'ossigeno con sostanze solide o liquide impermeabili all'aria*: (KOCH con lastre di mica, SANFELICE con lastre di vetro; LUBINSKI, NIKIFOROFF mediante vetrini portaoggetti a goccia pendente; BRAATZ con vetrini portaoggetti; HESSE mediante uno strato di gelatina od olio; ESMARCH servendosi di colture arrotondate ecc.);
- V. *Sostituzione dell'aria delle colture con altro gas*: idrogeno: anidride carbonica (FUCHS, BLUCHER, BUCHNER, FRAENKEL, BOTKIN, GRUBER, HUEPPE, PETRI, MAASSEN, ROUX, HEIM, KITASATO);
- VI. *Assorbimento dell'ossigeno con sostanze chimiche fuori del substrato*: (BUCHNER pirogallato potassico; DROOSSBACH acetato di cromo ed ossidulo di ferro);
- VII. *Assorbimento dell'ossigeno libero con sostanze chimiche sciolte nel substrato*: (KITASATO: glucosio 2 %, formiato sodico 0,3-0,5 %; WEIL: solfo indigotato di soda 0,1 %, resorcina pura 0,1 %);
- VIII. *Colture sincrone di aerobi ed anaerobi*: (ROUX, SALOMON);
- IX. *Metodi combinati*: (FERMI: eliminazione dell'ossigeno col calore, coadiuvato da uno strato di paraffina, di vasellina o d'olio di paraffina e combinato con l'assorbimento per mezzo del pirogallato potassico).

In base a questi principali metodi di colture anaerobiche molti altri se ne sono escogitati dai numerosi studiosi che si occuparono dell'argomento; metodi tutti che passeremo in rassegna nel nostro esame.

1° METODO: *delle uova* (HUEPPE).

Che le uova contengano naturalmente ossigeno non ha bisogno di essere dimostrato sperimentalmente.

2° METODO: *dell'eliminazione dell'ossigeno per mezzo del vuoto ottenuto con la pompa a mercurio* (GRUBER, CHAUVEAU).

L'anaerobiosi ottenuta con questo metodo non può essere mai perfetta restando sempre, come è noto, l'aria residuo nel vuoto che si fa.

Perciò è anche imperfetto il metodo descritto dal ZUPNIK pure basato sul vuoto ottenuto con la pompa a mercurio.

3° METODO: *dell'allontanamento dell'ossigeno con l'ebollizione dal substrato*.

Questo metodo del LIBORIUS se risponde bene per allontanare l'O² dal substrato, come dimostra l'esperienza del SANFELICE (1) non crea tuttavia un anaerobiosi assoluta.

Neppure il metodo vecchio del FERMI, che ha dato i migliori risultati, non elimina dal substrato tutto l'ossigeno libero come lo dimostra la seguente esperienza:

Dopo aver bollito il substrato per un'ora e più, coadiuvandone l'ebollizione con uno strato di paraffina, vi versavano alcune gocce di soluzione di acido pirogallico, previamente bollita e vi lasciavamo poi cadere un pezzo di idrato potassico, già liberato dall'O² scaldandolo in un recipiente contenente paraffina.

Risultato: Quando l'idrato potassico veniva a contatto dell'acido pirogallico si aveva annerimento del miscuglio, sebbene meno marcato, che nella prova non bollita.

G. AMPOLA e C. ULPIANI (2) hanno proposto un bellissimo metodo basato sull'ebollizione, che però non corri-

(1) Ann. Ist. d'Igiene sperim. della R. Università di Roma. Vol. II, (Serie nuova) Fasc. IV.

(2) Rivista d'igiene e Sanità Pubblica, anno 1899, pag. 907.

sponde ancora al nostro scopo. Essi fanno bollire il substrato e con un giuoco di rubinetti garantiscono l'uscita dell'ossigeno ed impediscono che il substrato venga in contatto con l'aria atmosferica.

4° METODO: *dell'allontanamento dell'ossigeno con sostanze solide o liquide impermeabili all'aria.*

Questo metodo come si disse fu seguito da molti sperimentatori. Il KOCH si servì delle lastre di mica; il SANFELICE usò lastre di vetro; il LUBINSKI ed il NIKIFOROFF usarono vetrini portaoggetti in goccia pendente; il BRAATZ vetrini portaoggetti; l'ESSE versava sulla coltura gelatina od olio; l'ESMARCH faceva colture arrotolate e poscia riempiva il tubo con olio o paraffina sterilizzati; il FERMI si servì della paraffina.

Un nuovo metodo fu proposto dal WRIGHT (1) in tubi di gomma entro provette: Egli aspira l'ossigeno dalla coltura e chiude piegando su se stesso il tratto di gomma libero.

È facile comprendere che questi semplici mezzi meccanici non possono dare una completa assenza di ossigeno. Difatti per ciò che concerne il metodo delle lastre sovrapposte è ormai noto che i microrganismi si sviluppano tanto alla periferia quanto al centro delle lastre.

Noi a proposito di questi metodi abbiamo fatto le seguenti esperienze.

a) *Sulla sovrapposizione delle lastre.* Abbiamo innestato anaerobi in agar in sottilissimi strati su portaoggetti; ricoprendo l'innesto con vetrini coprioggetti e luttando.

Risultato: Sviluppo in tutto il terreno di coltura.

Questo risultato che non abbiamo mai avuto con processi di colture anaerobiche più rigorosi, dimostra chiaramente l'imperfezione del metodo che abbiamo preso in esame.

b) *Sulla sovrapposizione di paraffina o di gelatina o di olio al substrato.* In una provetta abbiamo versato pochi cmc. di soluzione di ac. pirogallico ed il resto della provetta l'abbiamo riempito di paraffina, di vasellina o d'olio

(1) Centralblatt f. Bact. 15 Gennaio 1900, pag. 74. « A simple method for anaërobic cultivation in fluid media ».

pure bolliti; quindi lasciavamo cadere un pezzo di idrato potassico, previamente scaldato in un recipiente contenente una delle sostanze per liberarlo dall' O^2 aderente.

Risultato: Quando l'idrato potassico giungeva in contatto della soluzione di acido pirogallico si aveva annerimento del miscuglio.

5° METODO: *della sostituzione dell'aria della cultura con altro gas: idrogeno, anidride carbonica* (FUCHS, BLUECHER, BUCHNER, GRUBER, FRAENKEL, BOTKIN, HUEPPE, PETRI, MAASSEN, ROUX-HEIM, KITASATO).

Questo metodo modificato e perfezionato in molte guise dai vari autori che se n' occuparono lascia sempre nelle colture ossigeno in quantità dimostrabile, come risulta dalle seguenti nostre esperienze:

a) Sulla sostituzione dell'aria della coltura mediante H^2 .

1° Ci siamo serviti di questa esperienza dello stesso apparecchio del BOTKIN per le colture piatte.

Collocavamo dentro di esso una capsula contenente una soluzione di ac. pirogallico ed un tubetto chiuso pieno di una soluzione di idrato potassico.

Entrambe le due sostanze erano state liberate come al solito dalle tracce di O^2 aderenti.

Facevamo passare per l'apparecchio una corrente di idrogeno oltre il tempo stabilito dagli autori, saldavamo i tubi alla lampada e scuotevamo l'apparecchio per far combinare l'ac. pirogallico coll'idrato potassico.

Risultato: Rapido annerimento del miscuglio.

2° Abbiamo fatto passare non soltanto per venti minuti, come fecero vari autori, ma anche per oltre due ore una corrente di idrogeno in un cilindro munito di tappo di gomma a due fori attraversati da due tubi di vetro piegati ad angolo retto, dei quali uno che serviva per l'entrata del gas, pescava nel fondo del cilindro in una soluzione di potassa caustica e l'altro, dal quale usciva il gas arrivava appena alla superficie interna del tappo. Nel fondo del cilindro collocavamo una piccola provetta con soluzione di acido pirogallico. Scuotendo l'apparecchio facevamo combinare le due sostanze.

Risultato: rapido annerimento del miscuglio.

In seguito a questi risultati, che ci dimostravano chiaramente la presenza di ossigeno negli apparecchi, abbiamo sostituito all'idrogeno, l'anidride carbonica, gas più pesante e meno diffusibile dell' H^2 . Pur ammesso che usando l' H^2 si riuscisse ad allontanare completamente l'aria dagli apparecchi, era difficile che questi potessero mantenere per il tempo necessario la loro atmosfera di idrogeno puro, specie se complicati come quello di DURAN-CRYLEZ a base di tappi e di tubi di gomma.

b) Sulla sostituzione dell'anidride carbonica all'aria della coltura.

1° Abbiamo ripetuto le due esperienze precedenti sostituendo all'idrogeno l'anidride carbonica ed abbiamo avuto il seguente

Risultato: costante annerimento del miscuglio.

2° In un tubo aperto da ambo i lati e munito di tappi di gomma con un foro attraversato da un tubicino di vetro, facevamo passare per un'ora e più anidride carbonica avendo prima collocato nel tubo una piccola quantità di acido pirogallico ed una provetta con una soluzione di idrato potassico. Facevamo quindi combinare l'acido pirogallico con la potassa dopo aver tappati o chiusi alla lampada i tubetti di entrata e d'uscita del gas.

Risultato: rapido annerimento del miscuglio.

Lasciando poi da parte il fatto dell'estrema difficoltà di scacciare tutto l'ossigeno mediante una corrente gassosa non bisogna dimenticare che alcuni gas come ad esempio l'anidride carbonica esercitano un'azione dannosa sullo sviluppo di molti microrganismi. L'idrogeno stesso non è forse completamente innocuo.

Mentre infatti il b. del carbonchio coltivato in presenza di idrogeno sporifica per due sole generazioni continuano invece senza modificarsi a sporificare per 15 generazioni in tubi di BUCHNER (VILLET) (1).

(1) Zeitschr f. Hygiene und Infektionskrankh. Bd. XXXV, 1900, pag. 420-437. « Die Sporenbildung des Milzbrandes bei anaerobiose ».

Per le esperienze e le considerazioni fatte non si ha assoluta eliminazione d'ossigeno neppure col metodo del PETRI-MAASSEN (1) e con quello del ROUX (2) modificato dall'HEIM, i quali sono basati precisamente sulla sostituzione di un'altro gas all'aria della cultura.

Lo stesso dicasi del metodo del PETRI (3) basato parimenti sulla sostituzione dell'aria della cultura con l'idrogeno, e del metodo di WILLIAM BULLOCH che non è altro che una modificazione del metodo BOTKIN (4).

6° METODO: *della fissazione dell'ossigeno libero per mezzo di sostanze chimiche aggiunte ai substrati.*

Questa forse sarebbe la miglior via che potrebbe garantire la completa assenza di ossigeno libero nel substrato, senonchè la maggior parte delle sostanze che si adoperano, ostacolano in genere lo sviluppo dei microrganismi, indipendentemente dalla sottrazione d'ossigeno, come lo ha dimostrato HIBLER (5) per la glicerina e per lo zucchero, le quali sostanze disturbano la sporificazione e la virulenza dei microrganismi.

Oltre a ciò si osserva che le sostanze riducenti fin ora usate (il glucosio al 2 0/10, il formiato sodico al 0,3-0,5 0/10, l'indigosolfato di soda al 0,5 0/10 (6) nelle proporzioni non dannose allo sviluppo dei microrganismi, sono dotate di un insufficiente potere fissatore.

Sostanze con forte potere riducente sarebbero il *pirogallato potassico* ed il *cloruro cromoso*, ma non sappiamo in quali proporzioni queste due ultime sostanze possono essere mescolate al substrato, senza alterarne le proprietà culturali.

(1) Arbeiten aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamt. Berlin, J. Springer.

(2) Annales de l'Institut Pasteur 2, 58.

(3) Centralblatt f. Bact. 22 Agosto 1900, pag. 196. « *Neue anaërobe Gelatineschälchen-Kultur* ».

(4) Centralblatt f. Bact. 5 Febbraio 1900, pag. 140. « *A simple apparatus for obtaining plate cultures or surface growths of obligate anaërobes* ».

(5) Centralblatt f. Bact. 1899, pag. 517. « *Zur Kenntnis der durch anaërobe spulpilze erzeugten Infektionserkrankungen etc.* ».

(6) Z. F. H. Vol. 8, 41.

7° METODO: *delle sostanze chimiche fuori dei substrati.*

Il BUCHNER ha usato pel primo il pirogallato potassico (1 grammo di ac. pirogallico e 10 cmc. di soluzione di potassa caustica 1: 10).

L'ARENS (1) ed il Hovy se ne servirono in seguito.

Questo metodo quantunque buono non vale a fissare tutto l'ossigeno come lo dimostra questa nostra esperienza.

Esperienza sul pirogallato potassico fuori del substrato. — In una capsula di vetro ripiena per metà di una soluzione di pirogallato potassico collocammo dritto un cilindro contenente una soluzione di acido pirogallico nonchè un lungo tubetto contenente una soluzione di potassa caustica e colla bocca emergente sull'ac. pirogallico.

Chiusa quindi la capsula con una lastra di vetro smerigliata spalmata di lanolina, e scuotendo quindi dopo alcun tempo leggermente l'apparecchio facevamo combinare le due sostanze nel cilindro producendo pirogallato potassico.

Risultato: annerimento del miscuglio sebbene non molto notevole.

Con questo metodo quindi non tutto l'ossigeno veniva fissato.

Il WRINGHT (2) ha modificato questo metodo senza però raggiungere un risultato migliore.

Egli colloca sotto all'imboccatura di culture alla ESMARK ed a quelle in matraccio un piccolo batufolo di cotone impregnato di acido pirogallico e di idrato sodico quindi chiude con tappo di gomma.

Il WILETT (3) temendo che le proporzioni della soluzione del BUCHNER non bastassero ha adoperato fino a 5 grammi di acido pirogallico e 30 grammi di potassa caustica, ma senza però curarsi se nel substrato v'era rimasto ossigeno.

(1) C. 11-15.

(2) Centralblatt f. Bact. Band XXIX, H. 2, pag. 61. « *A method f. the cultivation of anaërobie bacteria* ».

(3) Zeitschr f. Hygiene u. Infektionskrankh. Bd. XXXV. 1900. pag. 420. 4. 37 « *Die sporenbildung des Milzbrandes bei anaërobiose* ».

Lo stesso dicasi del NIKIFOROFF (1) e del BRAATZ (2), i quali col metodo delle colture in vetrino a goccia pendente, ideato dall'uno e perfezionato dall'altro, non potevano ottenere l'assenza completa dell'ossigeno libero dalla coltura perchè innestavano in un mezzo liquido contenente certamente ossigeno libero.

Il DROOSSBACK (3) ha raccomandato quale potente fissatore di ossigeno l'*acetato di cromo* e l'*ossidulo di ferro*. Noi abbiamo sperimentato con queste due sostanze, ma l'anaerobiosi ottenuta non raggiungeva il grado dei metodi nuovi da noi escogitati.

8° METODO: *delle colture sincrone di aerobi e di anaerobi* (ROUX-SALOMON).

Con questo metodo non si può avere naturalmente che la certezza d'una diminuzione dell'ossigeno e mai la completa assenza.

BEIERINCK non ha dimostrato la completa assenza di ossigeno quando ha ottenuto lo sviluppo del *granulo-bacterium butylicum* in substrati nei quali aveano vegetato blastomiceti per 20-30 generazioni e vi morirono per mancanza di ossigeno. KEDROWSKY infatti ottenne lo sviluppo di anaerobi anche in presenza di ossigeno coltivandoli sopra i prodotti di altri batteri.

9° METODO: Era naturale che si pensasse ad accoppiare fra loro i diversi metodi esposti per ottenere un'anaerobiosi migliore.

Il FERMI (4) infatti combinò il metodo dell'ebollizione con quello del pirogallato potassico fuori del substrato.

Egli faceva bollire i substrati coperti da uno strato di paraffina, di vasellina, o d'olio di paraffina raffreddava rapidamente, innestava attraverso lo strato sovrapposto non ancora solidificato e quindi capovolgeva nel pirogallato potassico.

(1) Zeitschr f. Hyg. u. Inf. Bd. 8. 1890.

(2) Centralblatt f. Bakt I Abt. Bd. 8. 1890.

(3) C. 15-15.

(4) Manuale dell' Ufficiale Sanitario — ANGELO CELLI.

L'EPSTEIN (1) combinò il vuoto ottenuto con la pompa a mercurio, con la sostituzione dell'aria delle colture con l'idrogeno.

Lo stesso PASTEUR e IOUBERT e CHAMBERLAND (2) si servirono di un metodo combinato basato sullo stesso principio del vuoto con la pompa a mercurio e della sostituzione dell'aria con un gas inerte.

Il KLEIN (3) si è servito della pompa e del pirogallato potassico.

Il KABRHEL (4) combinò la sostituzione dell'atmosfera culturale con l'idrogeno, assieme all'azione del pirogallato potassico. — WILLIAM BULLOCH (5) adopera parimenti l'idrogeno ed il pirogallato potassico.

Se anche tutti questi metodi sono eccellenti per isolare e coltivare gli anaerobi nessuno presenta i necessari requisiti per la soluzione dei problemi che ci siamo proposti, inquantochè con nessuno dei metodi di anaerobiosi conosciuti si ottiene l'assenza completa di ossigeno.

Noi ci siamo quindi posti alla ricerca di metodi e processi nuovi, che ci permettessero di ottenere l'assenza di ossigeno tanto nell'atmosfera culturale quanto nei substrati.

Nuovi metodi e nuovi processi di anaerobiosi.

METODO I. — Espulsione dell'O² dal substrato mediante l'ebollizione coadiuvata da uno strato protettivo di paraffina funzionante a mo' di valvola.

Ricerche preliminari. — a) Allontanamento dell'O² mediante l'ebollizione dai vari substrati.

Scopo di questa esperienza era di stabilire da quali dei substrati — brodo, gelatina, agar — fosse più facile al-

(1) Centralblatt f. Bact. 1898 pag. 266 Band XXIV « Apparat zur Kultur anaërober Bakterien ».

(2) Traité de microbiologie E. DUCLAUX. Vol. 1 pag. 117 « Cultures à l'abri de l'air »

(3) Centralblatt f. Bact. 1898 pag. 967.

(4) Centralblatt f. Bact. 1899 pag. 555.

(5) Centralblatt f. Bact. 1900 pag. 140.

lontanare l'ossigeno libero con l'ebollizione, impedendone il riassorbimento per mezzo di uno strato di sostanza impermeabile all'aria.

Abbiamo fatto bollire $\frac{1}{2}$ ora in vasellina a 150° C. (non ad un grado più elevato perchè la vasellina schizza) vari tubi di brodo, di gelatina e di agar, aggiungendo a ciascun substrato dieci gocce di soluzione al 5% di acido pirogallico bollita, facendo quindi bollire i substrati per altri cinque minuti. Abbiamo poi versato in ciascun tubo uno strato di paraffina continuando ancora l'ebollizione dei substrati per altri 10-15 minuti versando infine dell'esperienza dieci gocce di soluzione al 5% di idrato potassico, pure bollita. Dal maggiore o minore annerimento che verificavasi, si potea dedurre la maggiore o minore quantità di ossigeno libero rimasto nel substrato dopo l'ebollizione. Osservavamo il grado di annerimento a principio dell'esperienza, dopo tre e ventiquattro ore e dopo otto, venti e venticinque giorni.

Risultato: L'annerimento è stato costantemente più intenso nell'agar; meno intenso nel brodo e meno ancora nella gelatina.

b) Sull'efficacia di varie sostanze impermeabili all'aria da sovrapporre al substrato per proteggerlo durante e dopo l'ebollizione.

Le sostanze sperimentate furono l'olio d'oliva, la vasellina, la paraffina e la vasellina e paraffina mescolate assieme.

Procedevamo in questa esperienza come nella precedente, facendo però bollire i substrati ricoperti da 1 cmc. di una delle sostanze suddette.

Risultato: La sostanza più adatta allo scopo ci è risultata la paraffina, la meno efficace l'olio d'oliva, forse perchè in parte si saponifica con la potassa e si scioglie.

Sull'importanza dell'altezza dello strato delle sostanze suddette. — Con questa esperienza ci proponevamo di stabilire quale spessore dovesse avere la strato protettivo da porsi substrato.

Abbiamo perciò ripetuto l'esperienza precedente versando però sul substrato $\frac{1}{2}$ -1-3 cmc. delle predette sostanze.

Risultato: Appena ultimata l'esperienza l'annerimento del substrato appariva quasi uguale in tutti i tubi; in seguito invece mentre nei tubi con sottile strato andava sempre più aumentando, restava pressochè stazionario in quelli con alto strato.

Da ciò concludemmo che era bensì preferibile usare le varie sostanze protettive in alto strato; ma che durante l'ebollizione era meglio sovrapporre al substrato solo mezzo cmc. di sostanza, riservandoci di portarla a 3 cmc. ad operazione finita.

Ma il risultato dell'esperienza esposta ci diceva inoltre che l'ossigeno dell'esterno era capace di attraversare lo strato protettivo e diffondersi nel substrato.

Poteva perciò darsi che i microrganismi momentaneamente arrestati nel loro sviluppo per mancanza di ossigeno, si potessero sviluppare in seguito non appena questo gas fosse arrivato nel substrato. Sappiamo dalle esperienze di BOLLEY (1), come i batteri possano per lunghissimo tempo vivere di vita latente in un mezzo privo di ossigeno libero.

FERMI perciò nel suo metodo combinato capovolge le culture del pirogallato potassico.

Queste ricerche preliminari ci hanno condotto al seguente:

METODO I. — Espulso l'ossigeno dal substrato mediante la bollitura coadiuvata da $\frac{1}{2}$ cmc. di paraffina, versavamo su questa rapidamente solidificata, altra paraffina, eppoi una soluzione di pirogallato potassico (2) (fig. I) fino a due centimetri dall'orlo della provetta. Affinchè poi il pirogallato potassico non attraversasse per capillarità la paraffina e penetrasse nel substrato capovolgevamo i tubi.

Come indicatore dell'ossigeno contenuto nel substrato usavamo il pirogallato potassico stesso. Le prove di controllo non vennero dimenticate.

(1) BOLLEY cbd. II. Abt., Bd. 6, 33, 1900.

(2) Il pirogallato potassico come risultò anche a noi stessi dopo molte prove spiega il maggior potere assorbente quando è preparato così: KOH p. 10, ac. pirogallico p. 10, acqua p. 100.

Risultato: Il grado d'annerimento del pirogallato potassico nel substrato al momento dell'esperienza restava invariato anche dopo un mese, mentre aumentava nei relativi controlli.

La penetrazione dell'ossigeno veniva quindi impedita.

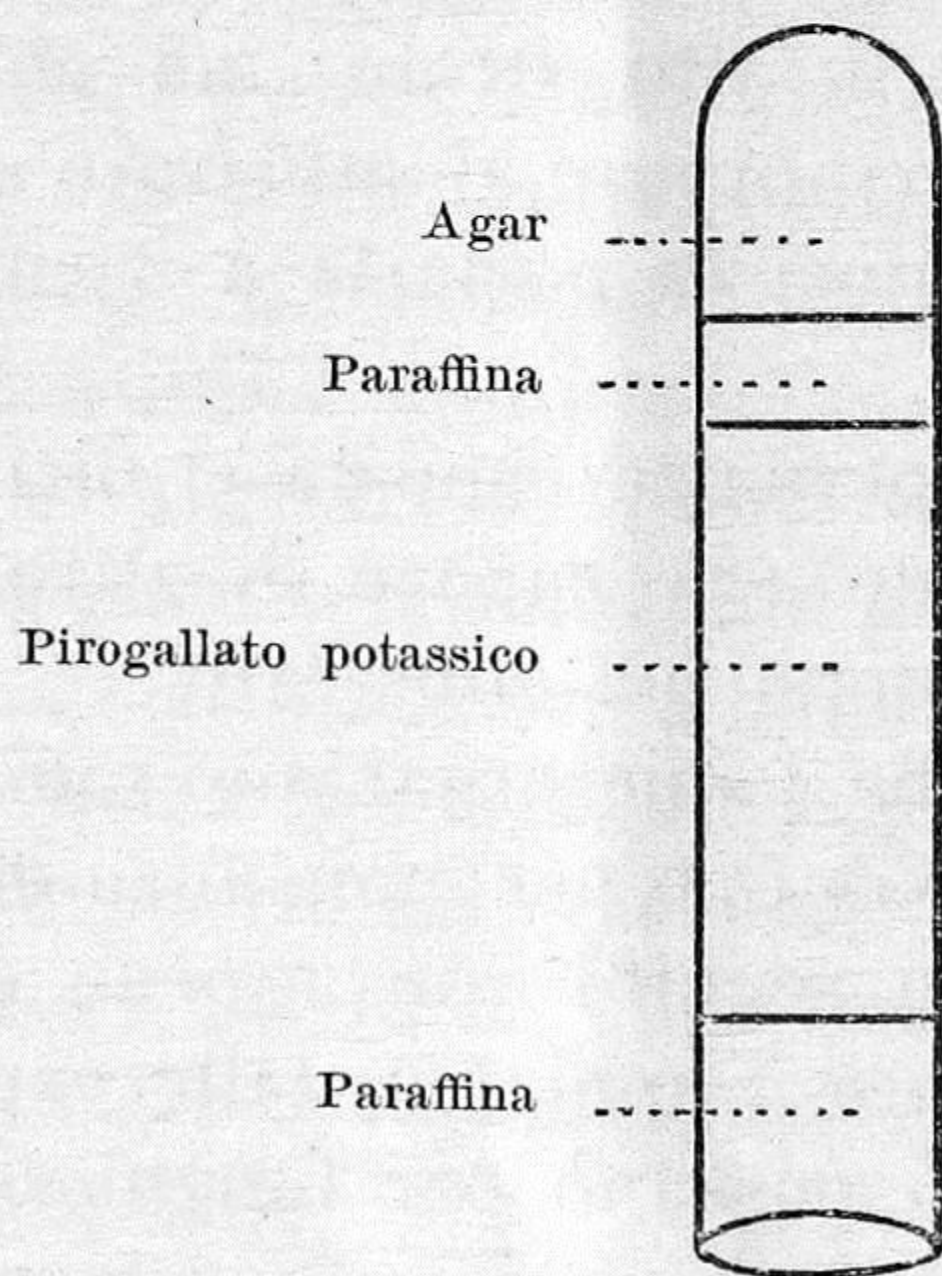


Fig. I.

METODO II. — *a)* Espulsione dell' O^2 mediante l'ebollizione a $105^\circ C.$ dal substrato protetto da uno strato di paraffina;

b) Strato di pirogallato potassico sulla medesima;

c) Chiusura con paraffina della provetta e sommersione di questa nell'olio.

Ricerche preliminari. — *a)* Sull'efficacia del capovolgere (1) le culture direttamente nel pirogallato potassico funzionante ad un tempo come mezzo assorbente dell' O^2 e protettivo contro l'entrata di O^2 dall'esterno.

Trattavasi di vedere se fosse indifferente capovolgere i tubi di cultura nel pirogallato potassico o metterli sempli-

(1) Il R. BURT RANSOM pubblica nel Centr. f. Bact. 1 Abth., vol. XXXVI, 1904, n. 4, una nota descrivendo presso a poco questo stesso metodo già descritto dal Fermi nel 1898 nel suo trattato di batteriologia contenuto nel Manuale dell'ufficiale sanitario, del prof. A. Celli, nonché da noi nel Central. f. Ract. 1 abt., vol. XXXV, n. 5.

cemente dritti basandoci sul fatto che la proporzione di ossigeno libero discende al disotto della tensione ottima, possono venire danneggiate certe funzioni dei microrganismi quali il movimento, la cromogenesi, le fermentazioni, ecc.

Risultato: Abbiamo sempre ottenuto un'anaerobiosi più rigorosa nei tubi capovolti, avendo ottenuti in questi sempre minore sviluppo.

b) Sull'influenza della chiusura ermetica dei recipienti contenenti le culture capovolte nel pirogallato potassico.

Volevamo vedere che influenza avesse il chiudere o no il recipiente contenente le culture in capsule ed in tubetti capovolti nel pirogallato.

Abbiamo ripetuto l'esperienza precedente collocando le culture in vasi aperti ed in vasi chiusi.

Risultato: Era quasi indifferente chiudere o no il recipiente. Ciò rilevasi pure dalla seguente tavola contenente i risultati di queste due ultime esperienze.

Microrganismi anaerobi-facoltativi e aerobi	Colture in tubi capovolti nel pirogallato potassico	Colture in tubi diritti nel pirogallato potassico	Colture in tubi capovolti nel pirogallato potassico in vaso aperto	Colture in tubi capovolti nel pirogallato potassico in vaso chiuso
Stafilococco piogene aureo .	+	+	+	+
» piogene albo .	+	+	+	+
Bac. tiphi	—	+	—	—
» prodigiosum	0	+	0	0
» pyocyaneum	0	(senza pigmento)	0	0
» rosso	+	+	+	+
» coli	0	0	0	0
» vulgaris	0	+	0	0
» cholerae gallinarum .	— —	+	—	—
» difteriae columbarum .	— ?	+	—	—
» radiciformis	—	+	—	—
» subtilis	+	+	+	+
	(senza pigmento)	(con pigmento)		
V. Metschnikoff	— —	— —	— —	— —
» Danubicus	0	0	0	0
» Viennensis	0	— —	0	0
Blastomiceta	0	—	0	0
»	0	— —	0	0
»	0	0	0	0
Oldium albicans	— —	0	—	0

c) Sull'immersione delle colture in un mezzo liquido per proteggerle dall'aria esterna.

Abbiamo sperimentato con l'acqua e con l'olio, immergendo in questi liquidi diverse provette contenenti eguale quantità di pirogallato potassico, chiuse con tappi di gomma o di sughero, per vedere anche la differenza fra questi due sistemi di chiusura.

Risultato: Il pirogallato potassico aveva conservato anche dopo due mesi l'identico colore che aveva al momento dell'esperienza. Il miglior mezzo di chiusura era costituito da tappi di gomma e dall'immersione nell'olio.

Dai risultati delle esperienze fatte abbiamo potuto ricavare il seguente metodo (vedi fig. II):

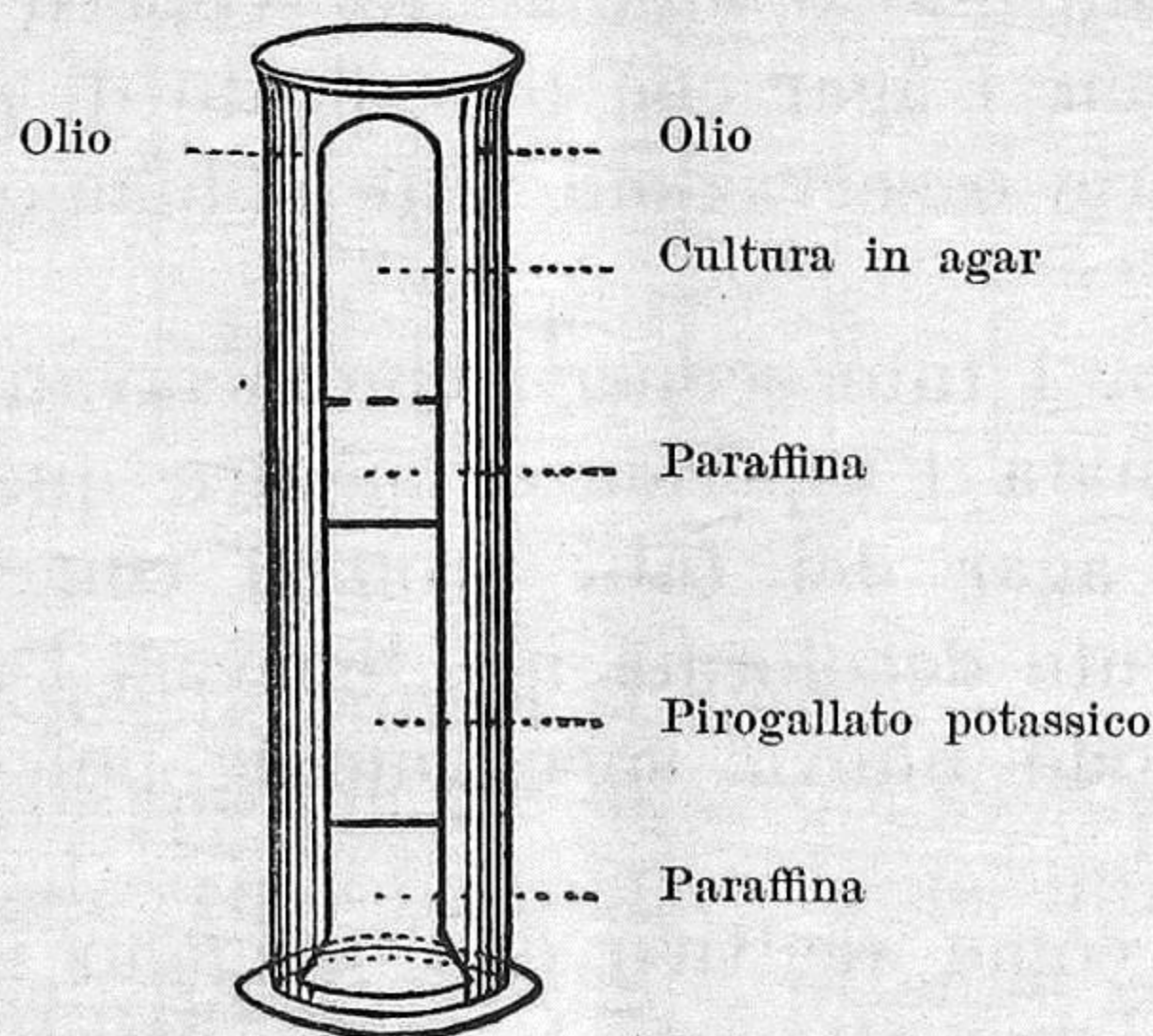


Fig. II.

a) Bollitura in vasellina a 105° per mezz'ora del substrato glucosato (2 per cento) ricoperto da mezzo cmc. di paraffina;

b) Ribollitura per altri cinque minuti;

c) Raffreddamento rapido; innesto attraverso la paraffina non ancora solidificata, e aggiunta di tant'altra paraffina fino ad avere uno strato protettivo di 3 cmc.;

d) Soluzione di pirogallato potassico fino a due centimetri dall'orlo della provetta e quindiappare con paraffina;

e) Immersione della provetta capovolta in un cilindro contenente olio.

Che con questo nuovo metodo si ottenga una buona anaerobiosi, lo dimostra la seguente esperienza.

Questa basavasi sul fatto che se si aggiunge all'agar glicerinata di vari tubi il 2 per cento di zucchero d'uva ed un po' di bleu di metilene in sostanza (SANFELICE) (1) oppure in soluzione alcoolica concentrata di questa sostanza (KABRHEL) (2) e si fanno sterilizzare i tubi alla stufa, nel levarli da questa essi si mostrano incolori, perchè l'agar ha perduto l'ossigeno che aveva disciolto; mentre vanno colorandosi all'aria dalla superficie verso il fondo, man mano che vi si scioglie di nuovo l'ossigeno.

Noi proteggevamo alcuni di questi tubi lasciandone altri per controllo o totalmente scoperti o semplicemente proteggendone l'agar con uno strato di paraffina.

Nelle varie osservazioni fatte abbiamo sempre avuto il seguente:

Risultato: I tubi scoperti cominciavano a colorarsi appena terminata l'esperienza, mentre quasi incolora conservavasi l'agar dei tubi protetti con sola paraffina e completamente decolorata mantenevasi l'agar dei tubi del nostro metodo nuovo, specialmente poi se capovolti nell'olio.

Usando come reattivo dell'ossigeno il pirogallato potassico, abbiamo ottenuto lo stesso risultato.

Seguendo la tecnica di questo nuovo metodo, abbiamo sperimentato col b. del tetano, col b. dell'edema maligno e col b. del carbonchio sintomatico, accompagnando l'esperienza con le relative prove di controllo.

Ecco i risultati ottenuti:

(1) Ann. dell'Ist. d'igiene sperimentale della R. Università di Roma, vol. II, fasc. 4^o, serie nuova.

(2) Centralblatt f. Bact., 1899, pag. 555.

Microrganismi (Innesti ad infissione)	Agar non bollita	Agar bollita semplice	Agar bollita ricoperta con 1/2 cmc. di paraffina	Agar col 2 1/2 ‰ di pirogallato potassico	Metodo nuovo
Bacillo del tetano . . .	+	+	+	+	- - ?
Bacillo dell' edema ma- ligno	+	+	-	+	- -
Bacillo del carbonchio sintomatico	+	+	+	-	- -

Risultato: Da questa tabella si rileva:

1° Che lo sviluppo dei tre anaerobi obbligati va scemando mano mano che diminuiscono le ultime tracce di O² libero nel substrato, ciò che si ottenne con la bollitura, con lo strato protettivo di paraffina, col pirogallato potassico nel substrato ecc.

Col metodo nuovo descritto avevamo trovato un buon mezzo di anaerobiosi per colture ed infissione.

Era del massimo interesse di trovare un metodo adatto per colture a strisciamento, onde far risentire ai microrganismi maggiormente l'azione dei mezzi anaerobici.

METODO III. — Colture a strisciamento, capovolte nel pirogallato potassico.

In questa ricerca sperimentammo con anaerobi facoltativi e con alcuni aerobi.

Microrganismi	Colture a strisciamento in capsule capovolte nel pirogallato potassico semiaperte per controllo	Colture a strisciamento in capsule capovolte nel pirogallato potassico chiuse
Stafilococco aureus . . .	+ +	0
» citreus . . .	+ +	0
Bac. coli	+ +	0
» rosso	+ +	0
» fluorescens	+ +	0
» indicus	+ +	0
» pyocyaneum	+ +	0
» prodigiosum	+ +	0
» viscosus	+ + (gas)	+ + (gas)
» anthracis	+ +	0
» difteriae columbarum	+ +	0
» megatherium	+ +	—
» radiciformis	+ +	—
» subtilis	+ +	0
Penic. glaucum	+ +	0
Blastomiceta	+ +	0
»	+ +	0

Risultato: Lo sviluppo, mentre è stato abbondante nelle prove di controllo, è rimasto generalmente negativo in quelle a strisciamento in capsule

METODO IV. — *a)* ebollizione del substrato; *b)* strato protettivo di paraffina; *c)* innesto in corrente di CO²; *d)* pirogallato potassico fuori del substrato.

In una bottiglia *A* (fig. III) munita di tappo a due fori, attraversato da tubi di vetro, si fa passare per mezz'ora

una corrente di CO^2 possibilmente priva di ossigeno, e quindi si versa al fondo uno strato di agar glucosato bollito e bollente il quale così viene a sodificare in presenza di CO^2 e non riassorbe O^2 nel raffreddarsi.

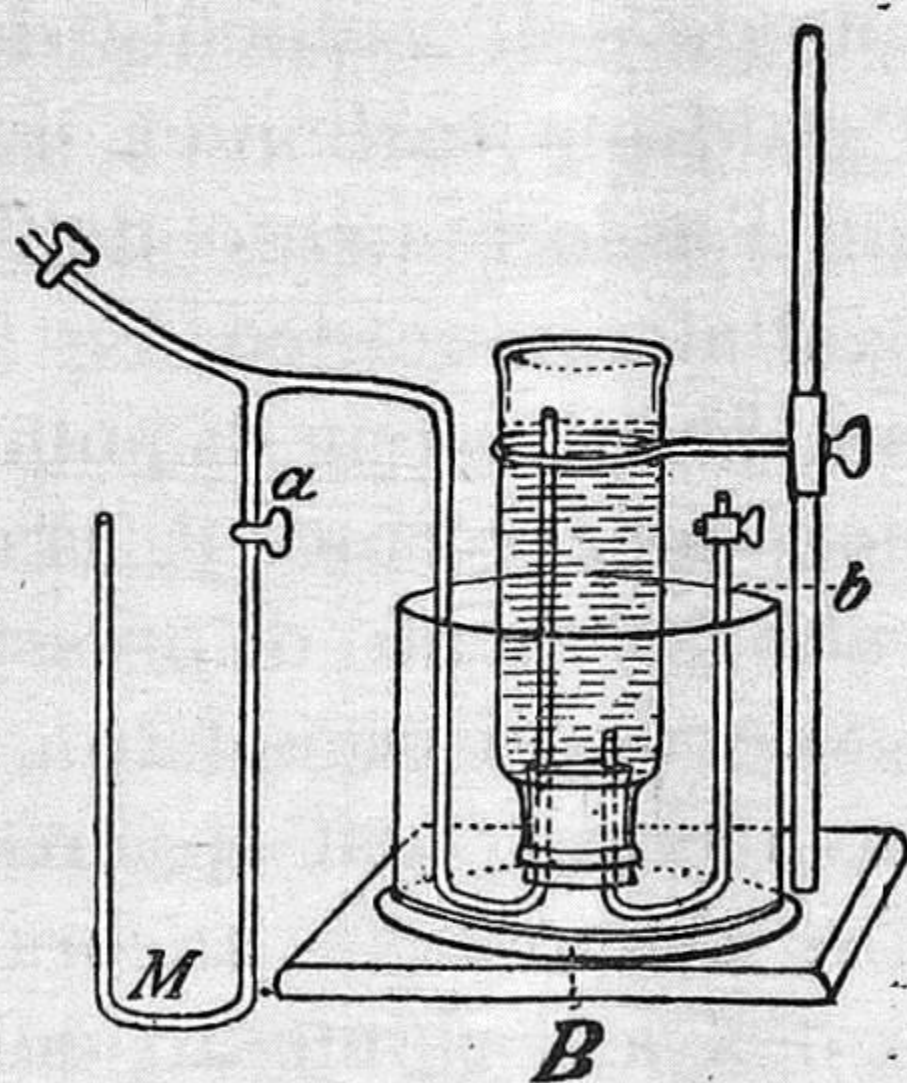


Fig. III.

Sempre in corrente di CO^2 s'innesta lo straterello di agar tanto a strisciamento come ad infissione. Si chiude quindi bene il tappo ricoprendolo di lanolina, e con due pinze si chiudono i due tubi $a-b$ pei quali passa la corrente di CO^2 .

Il recipiente di coltura così preparato, si capovolge, tenuto da un adatto sostegno, in una bacinella B contenente olio.

Per il tubo a si versa quindi una soluzione concentrata di idrato potassico, la quale va ad occupare la parte inferiore dell'apparecchio, e ne assorbe l'anidride carbonica. Si fa arrivare poi la soluzione di acido pirogallico al 10 0/0 in quantità tale da stare in giuste proporzioni con la potassa, ed a giusta distanza dal substrato.

Con questo metodo nuovo di coltura si ha:

a) eliminazione dell'ossigeno del substrato per mezzo dell'ebollizione impedendone anche il riassorbimento durante il raffreddamento del substrato;

b) assorbimento dell'ossigeno del substrato per mezzo di sostanze riducenti sciolte nello stesso substrato;

c) sostituzione dell'atmosfera della coltura con altro gas;

d) assorbimento dell'ossigeno col pirogallato potassico.

All'apparecchio di coltura di cui alla fig. III, *B* univano un manometro a mercurio *M*, il quale era l'indice della pressione residuale dell'ambiente della coltura dopo l'assorbimento dell'anidride carbonica da parte della potassa caustica e dopo l'assorbimento dell'ossigeno rimasto per mezzo del pirogallato potassico.

Risultato: Appena la soluzione di potassa caustica giungeva nell'interno dell'apparecchio, il manometro segnava subito un notevole abbassamento di pressione, che giungeva poi in seguito al vuoto quasi completo.

Quando facevamo arrivare nell'apparecchio l'acido pirogallico, il manometro si spostava ancora di qualche millimetro per il fatto dell'assorbimento delle ultime tracce di ossigeno rimasto.

Inoltre lo spostamento ultimo del manometro per la formazione di pirogallato potassico, sebbene non molto sensibile, ci indicava che ad onta del prolungato passaggio nell'apparecchio dell'anidride carbonica, era sempre rimasta qualche traccia di ossigeno libero. Facciamo notare questo, riferendosi a quanto riguarda la sostituzione di un altro gas all'atmosfera culturale, come mezzo anaerobico, di cui nella prima parte del presente lavoro.

METODO V. — *a)* Ricerche preliminari; preparazione del cloruro cromoso secondo il metodo di RECOURA; attività di questo preparato comparata con quella del cloruro cromoso, sublimato e dell'acetato cromoso.

Il cloruro cromoso, che fra i composti inorganici è forse il più energico fissatore di ossigeno, non è ancora entrato nella tecnica delle culture anaerobiche.

FERMI lo ha sperimentato per la prima volta insieme ad ULPIANI in alcune esperienze che non sono state pubblicate.

Abbiamo perciò voluto studiare questo composto, istituendo col medesimo alcune ricerche.

Preparavamo il cloruro cromoso secondo il metodo del RECOURA per riduzione del bicromato di potassa con zinco

ed acido cloridrico in ambiente di anidride carbonica (1). Facevamo passare per mezz'ora e più in un pallone di vetro ben lavato con acqua distillata, una corrente di anidride carbonica, la quale, fornita dal comune generatore composto di due bottiglie MARIOTH (2), vi entrava per un tubo di vetro che, attraversando il tappo di gomma, raggiungeva quasi il fondo del pallone e ne usciva per un altro tubo di vetro che arrivava solo alla superficie interna del tappo. Mettevamo quindi nel pallone:

300 grammi di zinco granulare:

50 » di bicromato di potassa reso in minutissima polvere;

300 cc. di acido cloridrico puro diluito in 200 di acqua distillata, sperimentando sempre in presenza di anidride carbonica.

Avveniva una reazione tumultuosa con abbondante sviluppo di gas, e solo a reazione compiuta ci servivamo del cloruro cromoso prodotto.

Se ora si fa passare una corrente d'aria attraverso a due bottiglie di lavaggio contenenti una soluzione di cloruro cromoso, la prima arresta completamente l'ossigeno, sicchè la seconda bottiglia non cangia punto di colore, mentre basta la menoma ossidazione per far perdere alla soluzione di protocloruro di cromo la sua perfetta limpidezza ed il suo bel colore blu-ametista, trasformandolo in un liquido verde ed opaco.

La preparazione relativamente lunga e delicata che richiedeva il metodo del RECOURA ci indusse a provare anche il cloruro cromoso del commercio (casa SCHUCHARDT).

(1) I dettagli di questa preparazione sono descritti nella Memoria dello stesso RECOURA, *Recherches sur le chlorure de chrome*, Ann. de Chim. et phys., serie VI, t. X, pag. 1. Per gli altri metodi di preparazione del cloruro cromoso, vedi WÖHLER, Ann. Ch. Pharm., III, S. 230; UFER, *ibid.*, 112, S. 281; MOBERG, I, pr. Chem., 29, S. 175, 43, S. 125; 44, S. 322, 327; PELIGOT, Ann. Ch. phys. (3), 12, pag. 327; Ann. Ch. Pharm., 52, S. 244; LOEWEL, Ann. Ch. phys. (3), 40, pag. 42; Jpr. Chem., 62, S. 11.

(2) Bisogna usare questo apparecchio e non quello del Kipp, poichè, come vedremo, è necessario per le esperienze un aumento notevole di pressione nell'anidride carbonica.

L'energia riducente di questo preparato è certamente superiore a quella di qualunque altro.

Per altro appunto per questa sua energia il cloruro cromoso del commercio è sempre alquanto ossidato cosicchè invece di essere bianco tende al verdognolo.

Ciò non ostante però conserva sempre le sue proprietà fortemente riducenti. Calcolando i pesi atomici abbiamo visto che approssimativamente una soluzione di questo cloruro cromoso al 50% avrebbe corrisposto al cloruro cromoso preparato da noi.

Inoltre quest'ultimo sebbene usato solo alla fine della reazione e quando la corrente di CO_2 dal tubo di uscita del pallone non arrossava più la carta reattiva, metteva certamente in libertà vapori di acido cloridrico.

Facendo arrivare una soluzione di tornasole sulla estremità dell'imbuto separatore assaggiammo l'acidità della atmosfera del pallone.

Abbiamo così potuto vedere che mentre l'atmosfera del pallone contenente la soluzione di cloruro cromoso sublimato non aveva reazione acida, questa verificavasi nel pallone del cloruro cromoso preparato da noi.

Non ostante però potemmo convincerci che questa acidità non ostacolava lo sviluppo di microrganismi.

Volendoci noi servire del cloruro cromoso del commercio era necessario stabilire sperimentalmente in quali proporzioni esso fosse più attivo.

Basandoci sul fatto che la tensione parziale dell'ossigeno rappresenta nell'atmosfera $\frac{1}{5}$ della pressione totale abbiamo fatto la seguente esperienza:

Attività del cloruro cromoso sublimato in varie concentrazioni.

In provette di egual volume mettevamo 100 mg. a 1 gr. di cloruro cromoso sublimato e vi versavamo quindi 30 cmc. di acqua distillata.

Dopo aver agitato la soluzione, ciò che facevamo in presenza di anidride carbonica, capovolgevamo in ciascuna provetta un tubetto lungo 25 cm. e chiuso all'estremità superiore e di eguale calibro in tutte.

Naturalmente la soluzione non saliva nel tubetto perchè impeditane dall'aria contenutavi, ma appena l'ossigeno veniva assorbito dal cloruro cromoso il liquido fissatore cominciava a salire tanto quanto era il vuoto formatosi.

Dall'altezza del livello del liquido nel tubetto potevamo in certo modo dedurre il maggiore o minore potere assorbente della soluzione.

Noi ci basammo specialmente sui risultati ottenuti dopo le 24 ore, avendo visto che questo tempo era più che sufficiente perchè tutto l'ossigeno venisse fissato; per cui trascorso questo termine potevamo mettere la nostra coltura in condizioni di temperatura di sviluppo.

Risultato: Soltanto dopo due ore e dal vario grado con cui il cloruro-cromoso saliva nei tubetti cominciò a notarsi il diverso potere fissatore delle soluzioni del medesimo.

Soluzioni	Altezza del cloruro-cromoso nel tubetto	Ora dell' osservazione
0,1 : 30	cm. 2,5	Dopo 24 ore
0,2 : 30	» 3	»
0,3 : 30	» { 4,8	»
	» { 5,2	»
0,4 : 30	» 5,2	Dopo 48 ore
0,5 : 30	» 5,2	»
0,6 : 30	» 5,2	»
0,7 : 30	» 5,2	»
0,8 : 30	» 5,2	»
0,9 : 30	» 5,2	»
1 : 30	» 5,2	»

Da questa tabella rilevasi come nelle condizioni nostre la soluzione di cloruro-cromoso più attiva fosse 0,4 : 30.

b) Esperienze istituite col cloruro cromoso.

ESPERIENZA I. — Facevamo attraversare il cilindro di vetro da una corrente di anidrite carbonica la quale entrando per il tubo di vetro ne usciva per l'altro tubo. I tubi entravano forzatamente nel tappo e per maggiore sicurezza venivano insieme a questo bene imparaffinati in tutta la superficie di contatto, i tubi di vetro poi si continuavano all'estremo in tubi di gomma muniti di pinze a pressione. Nella superficie interna del tappo era infissa una lastrina di vetro, pescante nel cilindro, un lato della quale portava un sottile strato di agar sostenuto da un orlo di paraffina.

Sullo strato dell'agar venivano fatti innesti a strisciamento, ad infissione ed a semina dei microrganismi che volevamo sperimentare.

Completato l'apparecchio, lo si poneva in comunicazione per mezzo del tubo con una sorgente di anidride carbonica onde scacciare tutta l'aria.

Mettendo quindi il cilindro *A* (fig. IV) in comunicazione col pallone di vetro *B*, in cui precedentemente era stato

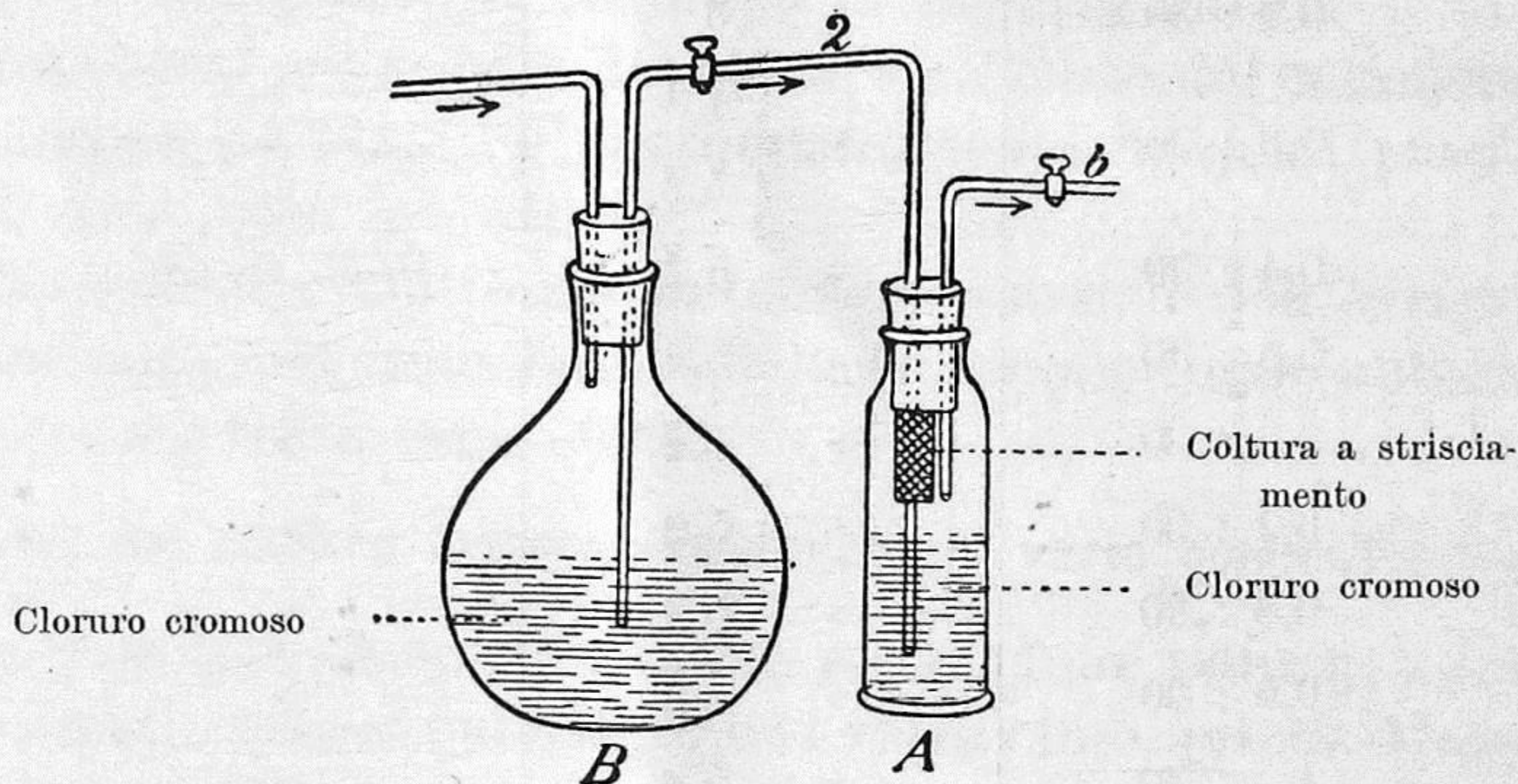


Fig. IV.

preparato il cloruro cromoso, questo veniva spinto nell'apparecchio di coltura da un aumento della pressione di anidrite carbonica, fino al livello voluto, senza che la lastrina

di coltura venisse mai a contatto con l'aria, restando in presenza di anidride carbonica.

Ad operazione compiuta si serravano le due pinze a pressione *a* e *b* oppure si saldavano alla lampada i due tubi strozzati precedentemente in modo opportuno.

Risultato: In questo modo creavamo attorno alla lastrina di coltura un ambiente anaerobico garantito:

1° dall'avere l'anidride carbonica sostituita l'aria del cilindro;

2° dal potere del cloruro cromoso di fissare l'ossigeno rimasto nel cilindro.

Avanti di porre le colture così preparate nel termostato si conservano nella ghiacciaia per 2-5 giorni allo scopo di non permettere lo sviluppo dei germi prima che il cloruro cromoso avesse avuto il tempo di fissare tutto l'ossigeno contenuto nel cilindro.

Ogni singola esperienza fu sempre accompagnata dalle prove di controllo mediante colture in cilindri sostituendo il cloruro cromoso con acqua per evitare l'essiccamento del sottile strato di agar lasciando gli altri cilindri semiaperti per decidere se il cloruro cromoso era nocivo allo sviluppo dell'innesto solo per la sua presenza indipendentemente dalla proprietà riducente.

E da questi controlli abbiamo potuto vedere che nessun'altra azione esercitava sull'innesto il cloruro cromoso all'infuori di quella riducente, dappoichè ebbimo sempre sviluppo di schizomiceti, di ifomiceti e di blastomiceti, quando permettevamo che l'ossigeno dell'aria atmosferica potesse, anche in tenuissima quantità giungere fino a questi.

ESPERIENZA II. — Per potere allestire un maggior numero di colture secondo il metodo esposto e per semplificarlo abbiamo sostituito ai cilindri le comuni provette (fig. V). Riempiendo per tre quarti col cloruro cromoso, chiudevamo ermeticamente con tappi di sughero in precedenza bolliti in paraffina portanti nella superficie interna la lastrina di coltura. Il tappo quindi veniva imparaffinato all'esterno o ricoperto di lanolina, e le provette così preparate venivano immerse in cilindri contenenti olio.

Abbiamo anche usati tappi di gomma attraversati da una bacchetta di vetro, cui con mastice attaccavamo la lastrina d'innesto.

Fra l'uno e l'altro sistema di chiusura non abbiamo notato differenze apprezzabili.

Come al solito non dimenticammo neppure in questo caso le prove di controllo nelle quali osservammo sempre sviluppo.

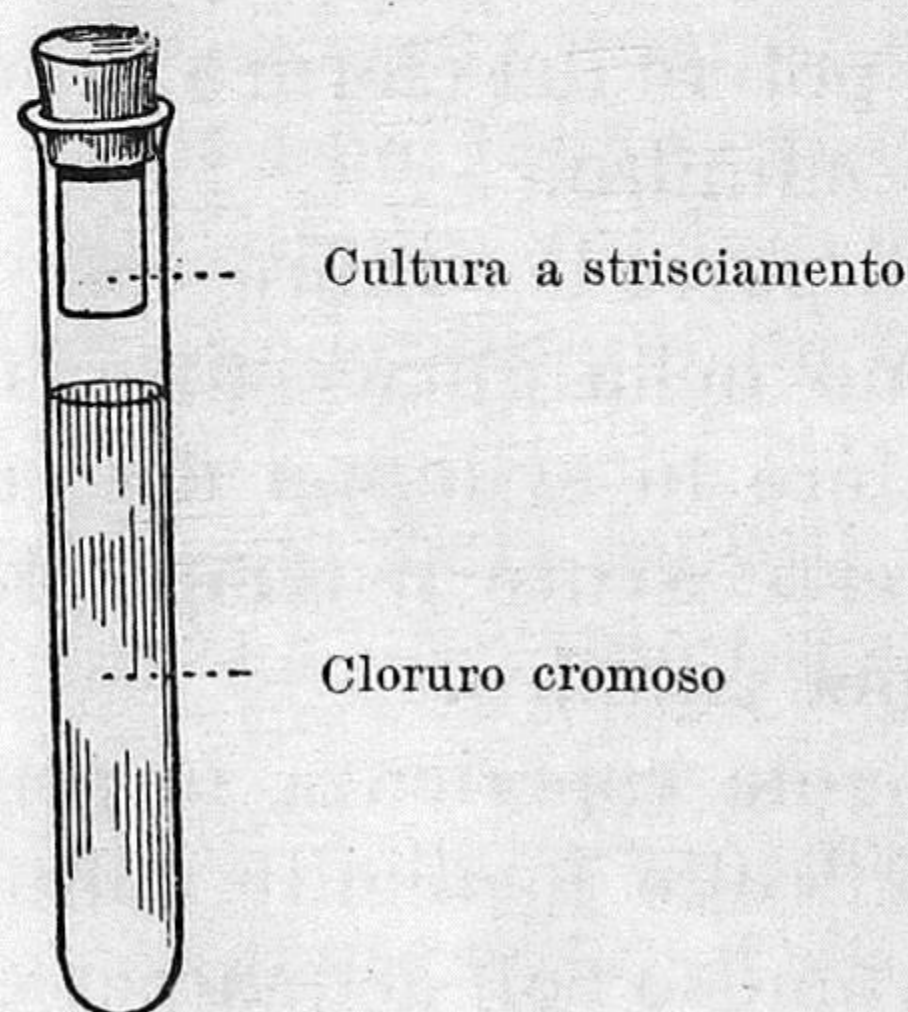


Fig. V.

Risultato: Questo metodo richiede molto rigore di preparazione per evitare l'ossidazione del cloruro cromoso nel distribuirlo nei recipienti di coltura.

Infatti noi vedemmo talora nella stessa esperienza una rapida ossidazione del cloruro cromoso di certe provette sempre accompagnata da sviluppo degli innesti.

ESPERIENZA III. — Per far risentire all'innesto maggiormente l'azione del cloruro cromoso, abbiamo cercato di portare la superficie libera di questo fino quasi a lambire il substrato.

Ci siamo serviti perciò di provette (fig. VI) che riempiamo di cloruro cromoso quasi totalmente, sperimentando sempre in ambiente di anidride carbonica.

Chiudevamo le provette con tappi di gomma nella superficie interna dei quali attaccavamo la lastrina di coltura, rappresentata da un vetrino coprioggetti rotondo, coperto da un leggero strato di agar.

Risultato: Questo sistema corrispose completamente, inquantochè il cloruro cromoso si ossidava lentamente.



Fig. VI.

ESPERIENZA IV. — Stendevamo un sottile strato di agar sulla superficie interna del fondo di cristallizzatori comuni (fig. VII).

Dopo averli innestati, li capovolgevamo in una capsula a pareti alte, con coperchio smerigliato, riempiendola di cloruro cromoso dopo aver appiccicato la parte esterna del fondo del cristallizzatore *A* alla parte interna del coperchio della capsula *B*.

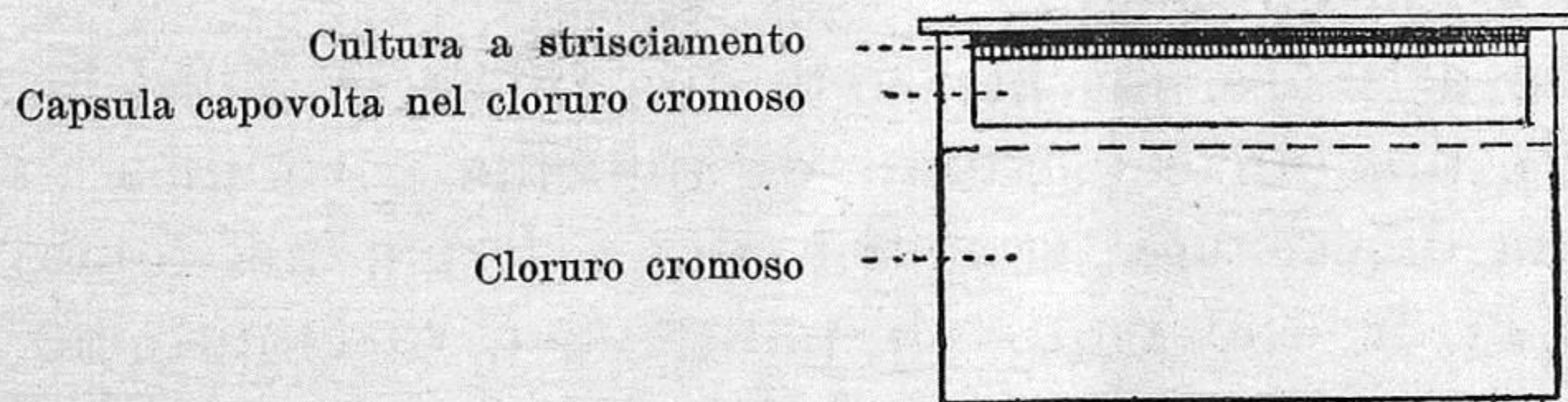


Fig. VII.

Risultato: Con questo metodo, pure eccellente, dovendo immergere con rapidità la capsula di coltura in un'altra più grande, ne avveniva che il volume dell'aria infrapposta fra il cloruro cromoso e la coltura, fosse alquanto grande. Per ovviare a questo inconveniente istituimmo quest'altra ricerca.

ESPERIENZA V. — Abbiamo sostituito ai cristallizzatori il coperchio delle capsule del Petri (fig. VIII) nel di cui fondo all'interno stendevamo il substrato. Attaccavamo poi la capsula alla superficie interna del coperchio smerigliato dell'altra capsula più grande *B*. In tal modo ottenevamo che il cloruro cromoso giungesse fin quasi a sfiorare il substrato.

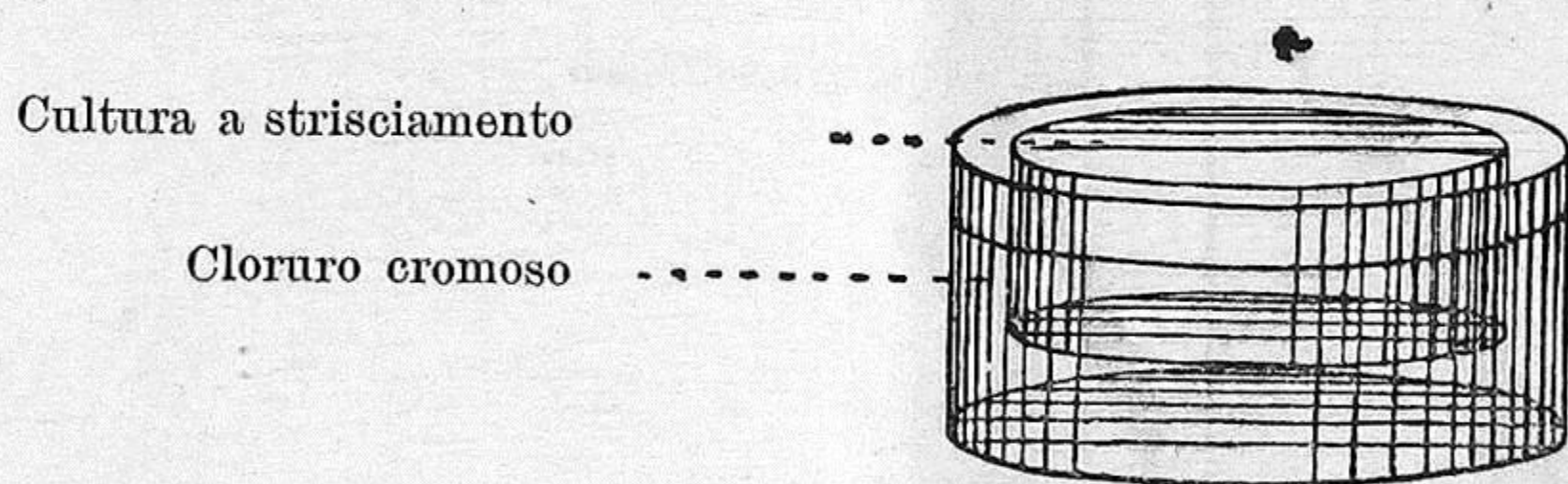


Fig. VIII.

Risultato: Seguendo questo procedimento, il cloruro cromoso conservava, più che nell'esperienza precedente, il suo colore azzurro. Ed alla prova biologica corrispondeva meglio, dappoichè erano marcatissime le differenze di sviluppo dai controlli fatti.

ESPERIENZA VI. — Allestimmo colture piatte, servendoci a mo' di capsula della superficie interna dei coperchi di pesafiltri (fig. IX e IX^a).

Esperimentavamo in ambienti di anidride carbonica procedendo a questo modo:

Facevamo arrivare, per mezzo di due apparecchi di KIPP (fig. X, *KK*¹), una forte corrente di anidride carbonica in una campana di cristallo *C* molto alta e larga, nel fondo della quale su di uno strato di paraffina e vasellina mescolate assieme *VV*¹, fissavamo tanto i cilindri *a a*¹ come i tappi *b b*¹ dei pesafiltri.

Dopo aver scacciato tutta l'aria dai cilindri *C* (e ce ne assicuravamo ponendo in fondo ai medesimi una provetta contenente una soluzione di acido pirogallico bollita, in cui poi facevamo cadere un pezzo di potassa caustica), e dopo aver lasciato ancora passare la corrente di anidride carbonica per una buona mezz'ora curando di mandarla nei singoli cilindri dei pesafiltri, come si vede in *a*, versa-

vamo nel fondo dei coperchi dei pesafiltri l'agar in strati sottili previamente bollito ed attraversato per parecchio tempo da una corrente di anidride carbonica. Appena solidificato l'agar, procedevamo all'innesto del microrganismo da sperimentare.

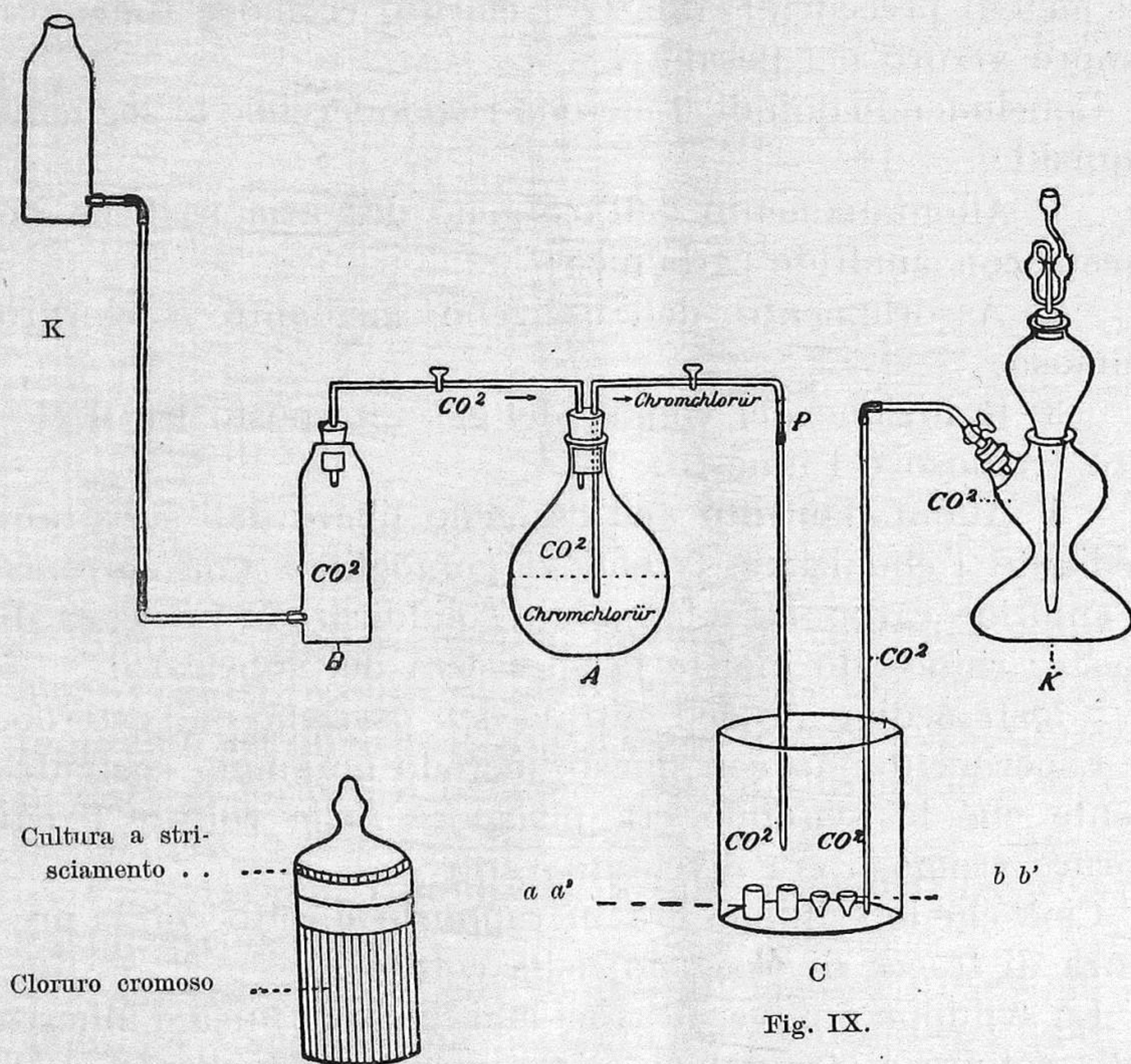


Fig. IX a.

Fig. IX.

Ciò fatto, e dopo avere assaggiato l'acidità dell'anidride carbonica che usciva dal tubo e dell'apparecchio A contenente il cloruro cromoso, per mezzo di un tubo di vetro *J* facendo aumentare la pressione dell'apparecchio *B*, portavamo nei cilindri dei pesafiltri, come si vede in *a*¹, il cloruro cromoso in quella quantità da noi voluta, poichè ne regolava il passaggio la pinza a pressione *P*.

Riempito ogni singolo pesafiltro veniva subito tappato e si spalmava con una miscela di vasellina-paraffina il coperchio. Seguendo questo metodo si hanno i seguenti vantaggi:

1° Si esperimenta sempre in ambiente di anidride carbonica;

2° Il volume di gas, interposto fra la superficie libera del cloruro cromoso e l'innesto è ridotto moltissimo.

Risultato: Con questo metodo ottenemmo varî vantaggi sui metodi precedenti; difatti il cloruro cromoso rimaneva sempre azzuro nei pesafiltri.

Concludendo quindi, il metodo risponderebbe ai seguenti requisiti:

1° Allontanamento dell'ossigeno dell'aria, sostituendo questa con anidride carbonica;

2° Assorbimento dell'ossigeno mediante il cloruro cromoso;

3° Riduzione del volume del gas interposto fra il cloruro cromoso e l'innesto;

4° Allontanamento dell'ossigeno libero dal substrato mediante l'ebollizione facendovi gorgogliare una corrente di anidride carbonica e facendolo solidificare in presenza di questa; riducendo inoltre la spessezza del substrato;

5° Impedimento dell'entrata dell'ossigeno dall'esterno.

Esperimentando con questo metodo notammo costantemente che lo sviluppo era maggiore nelle colture il cui cloruro cromoso era diventato verde.

Cioè che lo sviluppo era in rapporto diretto con la presenza di tracce di ossigeno nella coltura.

Lo sviluppo non verificavasi mai lungo la linea d'innesto nelle colture a strisciamento, raramente in quella ad infissione, ma più nelle colture a semina.

In tutte poi le esperienze di controllo nelle quali lasciamo penetrare aria avevamo abbondante sviluppo.

METODO VI. — Potere riduttore del fosforo. Espulsione dell' O^2 mediante l'ebollizione ed una corrente di CO^2 . Assorbimento dell' O^2 mediante il fosforo ed il pirogallato potassico.

Si sa che il miglior fissatore dell'ossigeno dell'aria atmosferica è il fosforo specialmente acceso; per altro l'azione dannosa che esso esercita sullo sviluppo dei microrganismi lo rende poco adatto al nostro scopo.

a) Esperienza col fosforo a temperatura ordinaria.

Allestimmo colture a strisciamento di varî microrganismi (fig. X) e le abbiamo chiuse ermeticamente mediante un tappo imparaffinato fissando a questo un pezzetto di fosforo del peso di un grammo.



Fig. X.

Altri sei tubi li abbiamo lasciati di controllo semplicemente chiusi. Avanti di porre le colture nel termostato le tenevamo per qualche giorno a bassa temperatura, allo scopo di dare al fosforo il tempo di fissare l'ossigeno avanti di permettere lo sviluppo dei germi.

Preparavamo i controlli in tubi semiaperti contenenti parimenti fosforo.

Risultato: Nei tubetti contenenti fosforo trovammo uno sviluppo maggiore che nei tubi di controllo nei quali osservammo un numero grandissimo di colonie di varî microrganismi.

ESPERIENZA VII. — In un'ampia campana *A* (fig. XI) attraversata da una corrente continua di anidride carbonica, si colloca un pallone di vetro *B* precedentemente lavato con pirogallato potassico e contenente una soluzione di acido pirogallico.

Si sospende al tappo per mezzo d'un filo di amianto un pezzo di fosforo *F*, che viene acceso toccandolo colla punta di una bacchetta di vetro arroventata e poi si tappa il pallone.

Così facendo l'ossigeno del pallone viene assorbito ed i vapori di perossido di fosforo dannosi ai microrganismi vengono fissati dalla sottostante soluzione di acido pirogallico.

Cessati i vapori bianchi si toglie il tappo *C* dal palloncino e si sostituisce con altro tappo *C'*, in cui è stata infissa una lastrina *D* portante lo strato di agar, innestato, in presenza di anidride carbonica, nella stessa campana *A*.

Mentre sta per chiudersi il pallone col tappo di coltura si lascia cadere nella soluzione dell'acido pirogallico, un pezzo di potassa caustica per cui al pirogallato potassico formantesi, resta il compito di fissare le ultime tracce di ossigeno che eventualmente possono essere rimaste nel palloncino.

Il tappo viene ricoperto tutto in giro con paraffina o lanolina e poi si pone la cultura nel termostato.

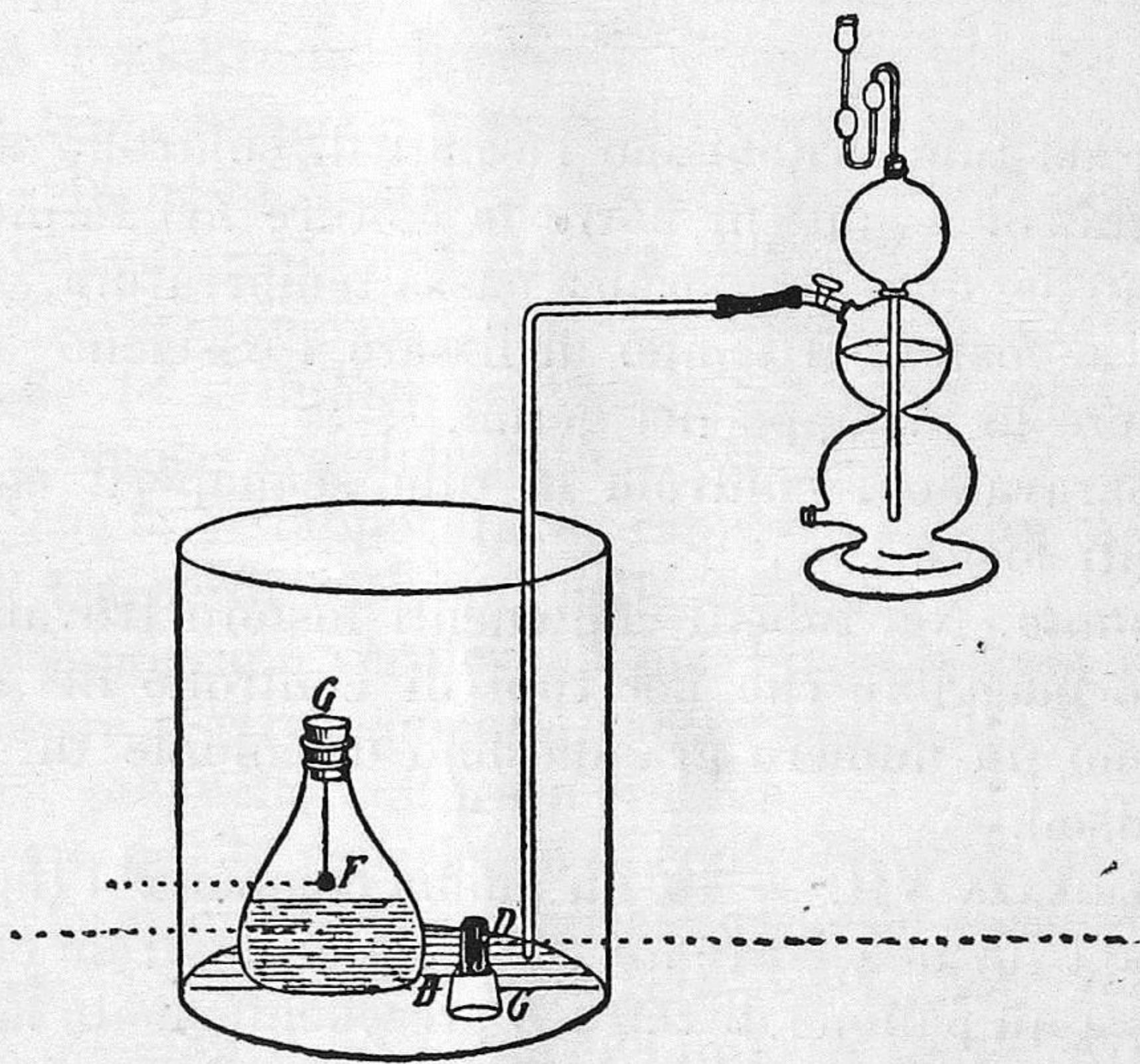


Fig. XI,

Questo metodo ci mette in condizioni di poter usufruire nello stesso tempo dei seguenti mezzi anaerobici:

- a) Assorbimento dell'ossigeno col fosforo acceso;
- b) Assorbimento dell'ossigeno col pirogallato potassico;

c) Esclusione dell'ossigeno dal substrato mediante l'ebollizione;

d) Assorbimento dell'ossigeno del substrato mediante una sostanza riducente sciolta dentro:

e) Riduzione al *minimum* dell'ossigeno residuale del substrato, versando questo in sottilissimo strato;

f) Esperimentare in ambiente di anidride carbonica.

METODO VII. — Potere fissatore dei blastomiceti.

In questa serie di esperienze abbiamo cercato di usufruire dell'avidità colla quale i blastomiceti fissano l'ossigeno.

Anzitutto abbiamo però voluto accertarsi che i blastomiceti non impediscano lo sviluppo degli anaerobi.

Infatti mediante apposita esperienza abbiamo visto che detti microrganismi si sviluppano benissimo tanto in colture vive che in colture morte di blastomiceti.

Per assicurarci poi se i blastomiceti avessero veramente un energico potere fissatore dell'ossigeno abbiamo fatto questa esperienza di orientamento.

Abbiamo preparato culture di lievito puro pressato al 5-10 % in brodo glucosato al 2 %; distribuimmo dette emulsioni in provette in ragione di 5 cmc. e vi versammo sopra uno strato di paraffina, di 2 cmc. Abbiamo poi a questa sostituita l'olio di paraffina, perchè i gas che si producevano per il potere fermentante dei blastomiceti finivano per cacciare il disco di paraffina soprastante alla coltura.

Era naturale che i blastomiceti in queste condizioni non potessero usufruire che del solo ossigeno sciolto nel substrato e che quindi dovessero mano mano consumarlo.

Versando quindi nel substrato un indicatore di ossigeno dovevamo accorgerci della presenza o meno di questo nel substrato, e vedere, ripetendo l'esperienza in diversi tubi a vari intervalli, l'assorbimento graduale dell'ossigeno da parte dei blastomiceti.

Come indicatore dell'ossigeno noi usavamo al solito pirogallato potassico. Versavamo nei vari tubi preparati nelle identiche condizioni una uguale quantità di soluzioni bollite di acido pirogallico e di potassa caustica ogni qualvolta ci occorreva di esaminare il contenuto in ossigeno del sub-

strato. Questa ricerca la facevamo al momento dell'esperienza, dopo 2, 4, 10, 24 ore, dopo 2, 3, 4 giorni. Dal maggiore o minore annerimento del substrato rilevavamo la maggiore o minore quantità di ossigeno libero in essa contenuto.

Risultato: Abbiamo potuto constatare che nelle colture contenenti il 5 e 10 % di blastomiceti non verificavasi alcun annerimento del pirogallato potassico mescolato alle medesime mentre bastava soffiare nella coltura con una cannula attraverso lo strato di olio di paraffina per avere rapido ed intenso questo annerimento.

Ecco come usufruimmo delle proprietà riducenti dei blastomiceti:

Nei precedenti metodi di colture a strisciamento interponevamo uno strato di blastomiceti fra il substrato ed il vetro sul quale il substrato veniva versato.

Per controllare questo metodo distendevamo lo strato dei blastomiceti solo su di una metà della capsula della coltura anaerobica e facevamo gli innesti solo dopo aver lasciato ai blastomiceti il tempo di consumare l'ossigeno del substrato.

Nella seguente tabella riportiamo i risultati relativi a questa esperienza.

Microrganismi	senza blastomiceti	con blastomiceti
Bacillo del tetano	+	—
Bacillo dell' edema maligno	+	— —
Bacillo del carbonchio sintomatico . .	+	— ?
Anaerobi del formaggio:		
N. 1	+	—
» 2	+	—
Anaerobi da feci di lattanti:		
N. 1	+	— —
» 2	—	0
Anaerobi da liquidi putridi:		
N. 1	+	+
» 2	+	—

Risultato: Nella metà della coltura in superficie in corrispondenza dello strato di blastomiceti lo sviluppo era meno intenso che nell'altra metà.

METODO VIII. — Espulsione dell'aria mediante una corrente pura di CO^2 . Fissazione dell' O^2 residuale mediante il rame rovente. Vuoto mediante la pompa a mercurio.

Ecco come si può procedere con questo metodo (vedi fig. XII).

1. Si prende un lungo tubo (A) di quelli a pareti spesse usati per la combustione delle sostanze organiche e vi si introduce al fondo una data quantità di carbonato di manganese (a).

2. Ad una certa distanza dal carbonato di manganese si situa una data quantità di riccioli di rame (b).

3. Collocasi il tubo in posizione orizzontale e lo si provvede verso l'estremo di un refrigerante (B).

4. Introducesi nel tubo in corrispondenza del refrigerante una lastrina (c)

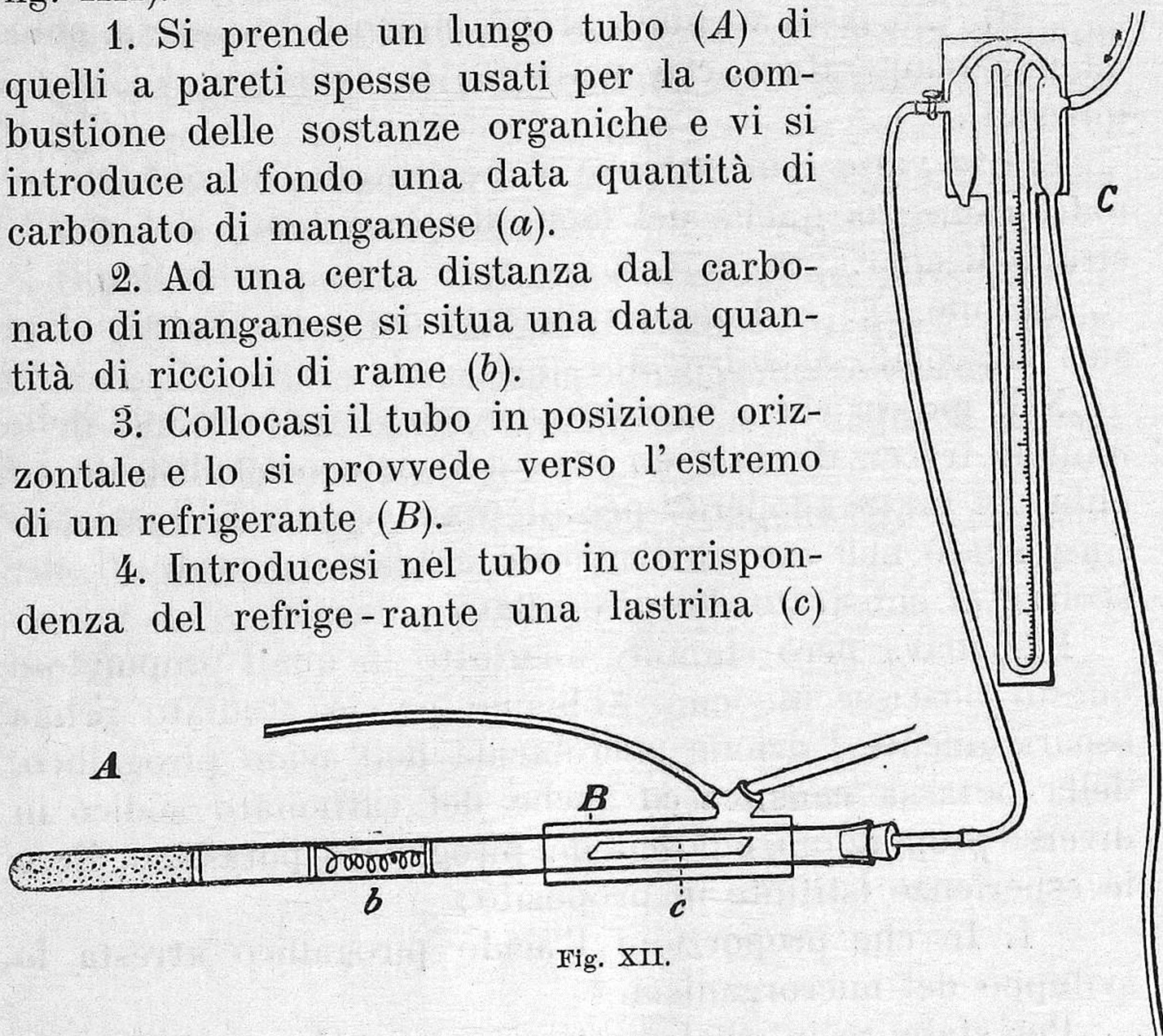


Fig. XII.

sulla quale si è fatto solidificare in corrente di CO^2 uno stratarello di agar portante le culture ad infissione ed a strisciamento degli anaerobi da studiarsi.

5. Si chiude il tubo con un buon tappo di gomma provvisto di un foro dal quale esce un corto tubo di vetro (d).

6. Riscaldando con una fiamma il carbonato di manganese generasi una corrente pura di CO^2 che scaccia l'aria.

7. Quando si crede che l'aria sia quasi tutta espulsa si fissano le traccie d'ossigeno arroventando con altra fiamma il rame.

8. Il refrigerante serve a impedire l'eccessivo riscaldamento della lastrina di cultura.

9. In ultimo mentre si sospende la produzione di anidride carbonica si fa il vuoto nell'interno del tubo mettendolo in comunicazione con la pompa a mercurio (c).

10. Ciò fatto si chiude ermeticamente il tubo e si pone ad una temperatura che permetta lo sviluppo dei germi innestati.

Fra le varie difficoltà che s'incontrano con questo metodo primeggia quella del facile disseccamento del sottile strato di agar.

METODO IX. — Potere riducente del pirogallato potassico mescolato al substrato.

Nell'ipotesi che i microrganismi possano servirsi delle minime traccie di ossigeno libero rimaste nel substrato ad onta dei mezzi adoperati per allontanarvelo o dell'ossigeno trasportato nell'atto dell'innesto, abbiamo pensato di mescolare al substrato del pirogallato potassico.

Bisognava però stabilire anzitutto in quali proporzioni questo riuscisse innocuo. Abbiamo perciò studiato prima separatamente l'azione microbica dell'acido pirogallico, della potassa caustica ed anche del carbonato sodico in diverse proporzioni, e poscia del pirogallato potassico. Ecco le esperienze istituite in proposito:

1. In che proporzioni l'acido pirogallico arresta lo sviluppo dei microrganismi?

Per stabilire in quali proporzioni l'acido pirogallico aggiunto al substrato, riesce innocuo preparavamo substrati col $\frac{1}{2}$ - 1 - 2 $\frac{1}{2}$ - 5 ‰ e 1 ‰ di acido pirogallico ed innestavamo diversi microrganismi tanto in capsula a strisciamento come in tubi ad infissione.

Risultato: L'acido pirogallico non disturba generalmente lo sviluppo neppure nelle proporzioni del 2 $\frac{1}{2}$ ‰.

2. In che proporzioni l'idrato potassico arresta lo sviluppo dei microrganismi?

Questa esperienza condotta come la precedente diede il seguente:

Risultato: L'idrato potassico comincia ad impedire lo sviluppo dei microrganismi nelle proporzioni del 5 ‰.

3. In quali proporzioni il carbonato sodico arresta lo sviluppo dei microrganismi?

Come con le due precedenti abbiamo sperimentato con questa sostanza ed abbiamo avuto il seguente:

Risultato: Il carbonato di soda non arresta lo sviluppo dei microrganismi studiati neppure nelle proporzioni dell'1 ‰.

4. In che proporzioni il pirogallato potassico arresta lo sviluppo dei microrganismi?

Stabilito il potere antisettico dell'acido pirogallico e della potassa caustica abbiamo ricercato in quali proporzioni il pirogallato potassico poteva venir tollerato,

Risultato: Il pirogallato potassico non disturba lo sviluppo nelle proporzioni del 2 ½ ‰.

I risultati di quest'ultima serie di esperienze si rilevano dalla seguente tabella.

Visto che il pirogallato potassico al 2,5. ‰ mescolato al substrato permette ancora lo sviluppo degli anaerobi abbiamo ripetuti i metodi I, II, III, IV e V aggiungendo al substrato il pirogallato potassico nella proporzione tollerata dagli anaerobi.

Risultato: In colture secondo i metodi I, II, III, IV e V, modificati aggiungendo al substrato pirogallato potassico nelle proporzioni tollerate degli anaerobi, questi spesso non si svilupparono.

Sviluppo degli anaerobi in superficie.

Nel nostro studio avevamo bisogno di servirci di colture in superficie come in quelle in cui si può maggiormente far risentire ai microrganismi l'azione dei mezzi anaerobici, così abbiamo voluto stabilire come si sviluppano gli anaerobi in superficie.

Ora l'osservazione quotidiana ci aveva insegnato che gli anaerobi anche nelle migliori condizioni di anaerobiosi difficilmente si sviluppano in superficie.

Questo fatto ci fece supporre che gli anaerobi per svilupparsi avessero bisogno, oltre che dell'assenza dell'ossigeno, anche di trovarsi immersi nel substrato, lontano dalla superficie libera, e quindi ad una certa pressione.

Questa ipotesi, che del resto è in conformità a quanto si verifica nell'animale in cui gli anaerobi preferibilmente si sviluppano nella profondità dei tessuti, doveva essere tenuta in conto speciale da noi.

La tecnica dell'esperienza era la seguente:

Attaccavamo con paraffina alla superficie interna di un coperchio di un cristallizzatore (fig. XIII A) il fondo di una capsula del Petri, la quale, preparata a questo modo andava naturalmente a capovolgersi nel cristallizzatore se questo veniva coperto.

Innestavamo a strisciamento al solito per tutto il diametro della capsula e poi solo nella parte mediana coprivamo le linee d'innesto con un vetrino portaoggetti *a*, che veniva fissato con paraffina, lasciando da una parte e dal-



1. The first group of people who are interested in the study of the history of the United States are the people who are interested in the history of the United States.

[illegible]

Risultato: Lo sviluppo in superficie generalmente scarso era pressochè uguale tanto sotto il vetrino porta oggetti come fuori di esso. Anche in questa esperienza verificavasi il solito fatto che lo sviluppo avveniva specialmente negli innesti a semina o ad infissione fra vetro e agar, mentre era scarsissimo o mancante negli innesti a strisciamento.

**Sullo sviluppo degli anaerobi
coltivati secondo i nuovi metodi colturali combinati fra loro.**

Le esperienze esposte ci avevano messo in condizioni di disporre di metodi molto efficaci nell'allestimento di colture anaerobiche.

Ne usufruimmo per studiare i problemi propostici.

Seguendo la tecnica di ogni singolo metodo, abbiamo innestato il b. del tetano, il b. dell'edema maligno, il b. del carbonchio sintomatico, ed inoltre microrganismi anaerobi isolati da formaggio, da liquidi putridi, da feci di lattanti, e qualche altro dal terreno, non dimenticando mai le prove di controllo consistenti in colture dello stesso microrganismo fatte sia secondo i vecchi metodi già da noi dimostrati imperfetti, sia secondo il metodo in esperimento, nel qual caso però lasciavamo penetrare l'aria.

Raccogliamo per brevità, i risultati nelle sottostanti tabelle:

Microorganismi	Agar col 2,5 o/100 di piro- gallato potassico	M E T O D I									
		I		II		III		IV		V	
		senza pirogall. potass.	con pirogall. potass.	senza pirogall. potass.	con pirogall. potass.	senza pirogall. potass.	con pirogall. potass.	senza pirogall. potass.	con pirogall. potass.	senza pirogall. potass.	con pirogall. potass.
Bacillo del tetano	+	—	—	—	0	—	0	—	0	—	0
Bacillo del carbonchio sintomatico	+	—	0 ?	—	0 ?	—	0	—	0	—	0
Bacillo dell' edema maligno . . .	+	—	—	—	0	—	0	—	0	—	0
Anaerobi dal formaggio parmig.:											
N.º 1	+	—	—	—	0	—	?	—	0	—	0
» 2	+	0	—	—	0	—	0	—	0	—	0
» 3	+	—	—	—	0	—	0	—	0	—	0
Anaerobi da liquidi putridi:											
N.º 1	+	—	—	—	0	—	0	—	0	—	0
» 2	+	—	—	—	0	—	0	—	0	—	0
» 3	+	—	—	—	?	—	?	—	0	—	0
Anaerobi da feci di lattanti:											
N.º 1	+	—	—	—	?	—	0	—	0	—	0
» 2	+	—	—	—	0	—	0	—	0	—	0
» 3	+	—	0	—	0	—	0	—	0	—	0
Anaerobi dal terreno:											
N.º 1	+	—	—	—	0	—	?	—	0	—	0
» 2	+	—	—	—	?	—	?	—	0	—	0

Microrganismi	I Metodo (Colture ad infissione)						II Metodo (Pirogallato potassico)		
	Metodo	Controlli					Metodo	Controlli	
		Agar non bollita	Agar semplice bollita	Agar col 2,5 per mille di pirogall. potass.	Agar bollita ricoperta con paraffina	Agar in tubi capovolti nel pirogall. potass.		Capsule capovolte nel pirogall. potass.	Capsule capovolte nel pirogall. potass. Agar 2,5 per mille
Bacillo del tetano .	—	++	++		+	+	—	++	+
Bacillo del carbonchio sintomatico.	— —	++	+		+	+	—	++	+
Bacillo dell' edema maligno	—	+	+		+	+	—	++	
Anaerobi del formaggio parmig.:									
N.º 1	—	+	+		+	+	—	++	
» 2	0	++	+		+	—	—	++	
» 3	—	+	+		+	+	—	++	
Anaerobi da liquidi putridi:									
N.º 1	— —	++	+		+	—	—	+	
» 2	—	++	++		+	—	—	+	
» 3	—	++	+		+	+	—	+	
Anaerobi da feci di lattanti:									
N.º 1	— —	+	+		+	—	—	+	
» 2	—	++	++		+	—	—	+	
» 3	—	+	+		+	+	—	+	
Anaer. dal terreno:									
N.º 1	—	+	+		+	+	—	+	
» 2	—	+	+		+	+	—	+	

Risultato: Dalla tavola esposta risulta:

1º Che gli anaerobi si sviluppano in presenza di tracce di ossigeno libero;

XIV. — Riassunto dei risultati.

1. Dal nostro esame critico sperimentale risulta che nelle colture anaerobiche secondo i vecchi metodi noti vi è sempre ossigeno libero.

2. Si ottiene un'anaerobiosi più completa facendo assorbire l'ossigeno della coltura per mezzo di una sostanza riducente, anzichè sostituendo all'atmosfera culturale un altro gas.

3. Fra le sostanze provate la più adatta per proteggere il substrato dall'aria durante e dopo l'ebollizione è data dalla paraffina o dall'olio di paraffina. La vasellina risponde meno bene e l'olio d'oliva può saponificarsi.

4. Si ha un'anaerobiosi più completa capovolgendo le colture in tubi direttamente nel pirogallato potassico, che ponendoli dritti in un recipiente chiuso contenente pure pirogallato potassico.

5. Fra i vari mezzi sperimentati per la chiusura delle colture in tubi il migliore è dato da buoni tappi di gomma ben legati e dalla susseguente immersione del tubo nell'olio di paraffina o di oliva.

6. Riguardo alle colture capovolte nel pirogallato potassico sono da preferirsi quelle a strisciamento in capsula a quelle ad infissione in tubi.

7. Il pirogallato potassico ottenuto dalla mescolanza di 10 gr. di potassa caustica e 10 gr. di acido pirogallico in 100 d'acqua è attivissimo essendo che con esso abbiamo ottenuto il massimum dell'assorbimento in due ore, mentre in altre proporzioni inverse abbiamo avuto lo stesso effetto dopo 48 ore.

8. Il cloruro cromoso sublimato introdotto da noi per la prima volta nella tecnica dell'anaerobiosi è certamente più attivo e meno dannoso allo sviluppo dei microbi del cloruro cromoso preparato secondo il metodo di Recoura.

9. Il cloruro cromoso sublimato è già molto attivo nelle proporzioni di 0,4:30. In 24 ore assorbe tutto l'ossigeno dell'atmosfera di uno dei comuni recipienti da noi adoperati.

10. Il fosforo nelle nostre condizioni d'esperimento non

ostacola lo sviluppo dei germi indipendentemente dal suo potere riducente.

11. Gli anaerobi si sviluppano benissimo tanto in simbiosi con i blastomiceti vivi quanto sulle culture morte e sui prodotti del ricambio dei medesimi.

12. I blastomiceti sono dotati di un forte potere riducente non inferiore a quello di molte sostanze chimiche.

13. Gli anaerobi si sviluppano meglio negli innesti ad infissione (come pure a semina) che in quelli a strisciamento anche quando l'anaerobiosi è la più completa.

Nuovi metodi e nuovi processi di anaerobiosi.

14. METODO I. — Espulsione dell' O^2 dal substrato mediante l'ebollizione, coadiuvata da uno strato protettivo di paraffina funzionante a mò di sifone o di valvola liquida.

15. METODO II. — *a)* Bollitura per $\frac{1}{2}$ ora del substrato glucosato (2 %) in vasellina a 105° ricoperto da $\frac{1}{2}$ cmc. di paraffina;

b) seconda bollitura protratta per altri 5';

c) raffreddamento rapido ed innesto attraverso la paraffina non ancora solidificata;

d) aggiunta di altri 2,5 cmc. di paraffina così da avere uno strato protettivo di 3 cmc. all'incirca;

e) soluzione di pirogallato potassico fino a due centimetri dall'orlo della provetta e tappare con paraffina;

f) immersione della provetta capovolta in un cilindro contenente olio.

16. METODO III. — *a)* Eliminazione dell'ossigeno dal substrato per mezzo dell'ebollizione, impedendone anche il riassorbimento nel raffreddarsi del substrato, mediante lo strato di paraffina;

b) assorbimento dell'ossigeno del substrato per mezzo di sostanze riducenti sciolte nel medesimo;

c) innesto in presenza di anidride carbonica;

d) sostituzione dell'aria della coltura con H^2 o CO^2 ;

e) assorbimento dell'ossigeno col pirogallato potassico 10 %;

f) protezione assoluta della coltura contro la penetrazione dell'aria esterna.

17. METODO IV. — *a)* Eliminazione dell'ossigeno dal substrato per mezzo dell'ebollizione impedendone anche il riassorbimento durante il raffreddamento del substrato;

b) assorbimento dell'O² dal substrato per mezzo di sostanze riducenti sciolte nel medesimo;

c) sostituzione dell'atmosfera della coltura con altro gas;

d) assorbimento dell'O² col pirogallato potassico.

18. METODO V. — *a)* Allontanamento dell'ossigeno mediante una corrente di anidride carbonica;

b) assorbimento dell'ossigeno mediante il cloruro cromoso;

c) riduzione del volume del gas interposto fra il cloruro cromoso e l'innesto;

d) allontanamento dell'ossigeno libero dal substrato sia mediante l'ebollizione che per mezzo di una corrente di anidride carbonica e facendo solidificare il sottile strato di agar in presenza di CO²;

e) impedire l'entrata dell'ossigeno dall'esterno.

19. METODO VI. — *a)* Assorbimento dell'O² col fosforo acceso;

b) assorbimento dell'O² col pirogallato potassico;

c) esclusione dell'O² dal substrato mediante l'ebollizione;

d) assorbimento dell'O² del substrato mediante una sostanza riducente sciolta dentro;

e) riduzione al minimum dell'O² residuale del substrato, versando questo in sottilissimo strato;

f) sperimentare in ambiente di anidride carbonica;

20. METODO VII. — Potere riducente dei blastomiceti. Ai metodi precedenti si unisce l'azione fissatrice dei blastomiceti mescolando questi, sia direttamente al substrato, che deponendoli previamente in sottile strato sulla lastrina di vetro sulla quale poi si versa lo straterello d'agar.

21. METODO VIII. — Espulsione dell'aria mediante una corrente pura di CO²; ottenuta col carbonato di manganese.

Fissazione dell' O² residuale mediante il rame rovente. Produzione del vuoto mediante la pompa a mercurio.

22. METODO IX. — Potere riducente del pirogallato potassico mescolato al substrato.

Gli anaerobi obbligati si sviluppano sopra substrati contenenti il 2,5 % di pirogallato di potassa.

23. Lo sviluppo degli anaerobi è maggiore quando vi sono tracce di ossigeno libero nel substrato che quando queste sono scomparse.

24. Quindi si può concludere:

1° *Che non esistono, tra i descritti, anaerobi obbligati nello stretto senso della parola, perchè tutti quanti in presenza di ossigeno si sviluppano.*

2° *Che non esiste alcun microrganismo conosciuto il quale in presenza di tracce di ossigeno libero non si sviluppi.*

3° *Che non esistono veri anaerobi facoltativi inquantochè nessuno dei medesimi si sviluppa anaerobicamente seguendo i metodi più efficaci da noi escogitati.*

XV. — Considerazioni finali.

Dal nostro lavoro resta dimostrato che non è completamente esatta la classificazione fin' ora accettata di *Aerobi* e di *Anaerobi* obbligati e facoltativi; ma noi crediamo ancora opportuno intrattenerci su questo gruppo stranissimo di microrganismi, ritenuto estraneo alla legge comune di *Biologia*, e che ora, secondo noi, rientra in essa.

Dato che esista la vita anaerobica dovrebbe esistere necessariamente in natura l'ambiente privo di ossigeno, conveniente allo sviluppo degli esseri che a questo genere di vita appartengono.

Ora si dà in natura il fatto della completa assenza di questo gas così generalmente diffuso?

Esaminiamo un pò le condizioni naturali di vita degli anaerobi. Questi li troviamo tanto negli organismi, quanto nel mondo esterno.

Così nelle infezioni, p. es. nel *tetano*, essi penetrano per mezzo di profonde ferite, specie ferite da punta, dove l'os-

sigeno dell'aria non può arrivare e dove essi quindi possono svilupparsi indisturbati.

Li troviamo parimenti nelle putrefazioni dei liquidi, ove la loro vita è favorita dalla simbiosi con altre specie di microrganismi aerobi.

Ma il fatto che queste siano condizioni favorevoli allo sviluppo dei così detti *Anaerobi* non ci dice che essi si sviluppino facendo a meno dell'ossigeno, poichè bisognerebbe dimostrare che questo gas *vitale* manca assolutamente dai luoghi di *predilezione* di questo gruppo di microrganismi.

Il PASTEUR non dimostrò l'assenza completa dell'ossigeno dal luogo di sviluppo degli anaerobi quando rilevò il fatto che alla superficie di un liquido puzzolente si forma una pellicola di microrganismi aerobi sviluppantisi, i quali consumano l'ossigeno del liquido ed impediscono l'ulteriore ingresso di questo gas, permettendo così che nella profondità comincino gli anaerobi la loro opera; ed il BIENSTOCK (1) nell'affermare questo fatto con esatte esperienze con colture pure non provò l'esistenza vera della vita anaerobica, poichè non si curò di dimostrare se nei liquidi di sviluppo vi fosse ossigeno, ciò che era necessario per rendere esauriente l'esperienza.

Il KEDROWSKI (2) e lo SCHOLTZ (3) ci danno ragione su questo fatto, poichè dimostrando che anche gli *anaerobi stretti* possono coltivarsi in liquidi ed in vasi aperti senza esclusione di ossigeno, facendovi solo crescere insieme saprofiti aerobi; videro che un continuo e lento passaggio di aria non può impedire lo sviluppo degli anaerobi, il quale solo si arresta con un forte passaggio di ossigeno (cinque litri per ora in 5-10 cmc. di liquido nutritizio).

Queste esperienze ci dicono che se naturalmente gli anaerobi hanno bisogno della convivenza con gli aerobi per il loro sviluppo nei liquidi putridi, non è assolutamente necessaria la totale assenza di ossigeno.

(1) BIENSTOCK, Archiv. f. Hyg. Bd. 36, 5, 335.

(2) KEDROWSKI, Zeitschr. f. Hyg. u. Inf. Bd. 20, 1895.

(3) SCHOLTZ, Zeitschr. f. Hyg. 27, 132, 1898.

Ciò che del resto ci hanno dimostrato KITT (1) per il b. del carbonchio sintomatico, BRAATZ (2), BELFANTI e PESCAROLO (3), SANCHEZ TOLEDO e VEILLON (4), VAILLARD e VINCENT, GRIXONI, FERRAN, SANFELICE e VALAGUSSA (5) per il b. del tetano e BEIJERINCK (6) per il granulo-bacterium.

Da quanto abbiamo detto si deduce che come per le diverse specie di aerobi obbligati è diverso il grado di tensione dell'ossigeno libero voluto per il loro sviluppo, come dimostrarono ENGELMANN (7) e BEYERINCK (8), così per gli anaerobi esiste un *optimum* di tensione nel quale a preferenza essi si moltiplicano, come avviene per la temperatura, per la luce, per la concentrazione dei substrati nutritizii, per il quantitativo di sali, di acqua ecc. Infatti, come abbiamo visto dalle nostre esperienze, anche per questi esiste un *minimum* di tensione parziale di ossigeno, oltre il quale non è più possibile lo sviluppo.

E lo stesso fatto che i due citati autori videro per gli aerobi obbligati, i quali, sia visti microscopicamente in coltura liquida, sia osservati al microscopio in goccia pendente, si comportano secondo il maggiore o minore bisogno di ossigeno ed in relazione alla distanza dalla sorgente di questo, assumendo figure geometriche, stando sempre nel punto dell'ottimo di tensione di ossigeno; lo stesso fatto, dico, si verifica negli anaerobi, i quali anche loro vanno in cerca del punto di tensione ottima e si sviluppano a preferenza come ebbe ad osservare il SANFELICE e come è facile vedere confrontando lo sviluppo delle colonie periferiche con quelle centrali nelle colture in lastre ricoperte.

Rispetto all'ossigeno adunque, i microrganismi si com-

(1) Centralblat, V. 17, pag. 168.

(2) Centralblat, V. 17, pag. 168.

(3) Giornale della R. Accademia Medica di Torino, Maggio 1898.

(4) Arch. med. exper., pag. 709, 1890.

(5) Annali d'Igiene sperimentale della R. Università di Roma, Vol. 8, pag. 406.

(6) Archives Neerlandaises, T. II, Ser. 2^a, 1899, pag. 397.

(7) ENGELMANN, Botan. Zeitung., 1881, 441; 1882, 838; 1888, 626.

(8) BEYERINCK, Centralblat, f. Bak, t. I, Abt. Bd. 14, 837, 1893.

portano in modo diverso secondo il loro *optimum*, di tensione parziale per questo gas.

Infatti se la proporzione dell'ossigeno discende al disotto dell'ottimo di tensione, comincia a verificarsi, in certi microrganismi un danno ad alcune funzioni (movimento, cromogenesi, fermentazione, ecc.) e, se si ha un aumento di tensione può definitivamente mancare lo sviluppo, come ebbero a notare il SANFELICE (1) per il *proteus vulgaris* e per il *bac. subtilis*; OBICI (2) per il *b. della tubercolosi*; ENGELMANN per gli spirilli e il CHUDIAKOW (3) per il *b. sottile*.

Altri microrganismi invece anaerobi si sviluppano a preferenza in presenza di sole tracce di ossigeno libero.

Le nostre esperienze sulla simbiosi come mezzo di cultura anaerobica ci hanno inoltre dimostrato che gli anaerobi si sviluppano non solo coltivati assieme ai blastomiceti, ma anche sui prodotti del ricambio materiale di questi. Tale fatto ci fa pensare che gli stessi anaerobi possano da soli prepararsi la via allo sviluppo con i prodotti del loro ricambio materiale creandosi così l'ambiente necessario alla loro vita.

TRENKMANN (4) vide infatti che l'idrogeno solforato è favorevole allo sviluppo degli anaerobi in presenza di ossigeno libero; e sappiamo d'altra parte che il terreno nutritizio ove si sviluppano gli anaerobi è sempre impregnato di idrogeno solforato e che lo sviluppo è specialmente rigoglioso sui terreni acidi formati da cervello.

A questo fatto si collegano le esperienze del KEDROWSKI (5) del NOVY (6) del KITZ (7) del BRAATZ (8) e del HIRLER (9)

(1) SANFELICE, Ann. di Igiene Sperim. della R. Università di Roma 1892 Vol. 2. pag. 345.

(2) OBICI, Centralbl. f. Bakt. 1. Abt. Bd. 19, N.º 9-10, 1896.

(3) CHUDIAKOW, Centralbl. f. Bakt. II Abt. Bd. 4. 389, 1898.

(4) TRENKMANN, Centralblatt. f. Bakt. 1 Abt. Bd. 23, 1030, 1087, 1898.

(5) KEDROWSKI, Zeitschr. f. Hyg. u. Inf. Bd. 20. 1895.

(6) NOVY, Centralblatt f. Bakt. I Abt. Bd. 14, 581, 1893.

(7) KITZ, ebd. I Abt. Bd. 17, 168, 1895.

(8) BRAATZ, ebd. I Abt. Bd. 17, 737. 1895.

(9) HIRLER, Centralblatt f. Bakt. 1899, pag. 517.

sullo sviluppo degli anaerobi in coltura pura in terreni liquidi ed in presenza d'aria. A noi sembra perciò verosimile la spiegazione che a questo riguardo dà lo SCHOLTZ (1) il quale dice che gli anaerobi nell'interno delle particelle di coltura od anche nel fondo dei grandi recipienti culturali vi trovano un ambiente completamente aerobico e sono loro che pensano a renderselo anaerobico impregnando il terreno nutritizio con i prodotti dei loro ricambi materiali. Così essi stessi sarebbero capaci di crearsi le condizioni necessarie alla vita loro.

E che effettivamente l'ossigeno, anche in minime tracce occorra al ricambio materiale degli anaerobi ce lo ha dimostrato il BEIJERINCK (2), il quale poté vedere che l'assoluta assenza di ossigeno non rappresentava l'ottimo di condizione favorevole allo sviluppo loro, poichè in presenza di minime tracce di ossigeno crescevano molto più intensamente. Parimenti CHUDIAKOW (3) dimostrò con esperienze esaurienti che la piccola quantità di ossigeno (0,5 %) favorevole allo sviluppo del *b.* dell'edema maligno e del tetano, non si comporta come un gas indifferente, ma viene effettivamente consumato nel ricambio materiale. GUNNING (4) e BEIJERINCK (5) dimostrarono parimenti che gli anaerobi si sviluppano meglio in presenza di piccole tracce di ossigeno.

Ma non si potrebbe comprendere che questi anaerobi possano aumentare in modo così enorme avendo solamente a disposizione loro minime tracce di ossigeno libero, mentre sappiamo da LUEBBERT (6), che per il primo studiò la respirazione dei bacteri, e da HESSE (7), che la studiò più

(1) SCHOLTZ, Zeitschr. f. Hyg. 27. 132, 1898.

(2) BEIJERINCK, Centralbl. f. Bakt. II. Abt. Bd. 6, 341, 1900.

(3) CHUDIAKOW, loc. cit.

(4) GUNNING, Journ. f. prakt. Chemie. N. F. vol. 16, N.º 17, pag. 20.

(5) BEIJERINCK, Centralblatt f. Bak. I Abt. vol. 11; pag. 73, 1892.

(6) LUEBBERT, Biolog. Spaltpilzuntersuchung. der staphyl. pyog. aur 1886, 5, 38, ff.

(7) HESSE, Zeitschr. f. Hyg. u. Infek. vol. 173, 17, 183, vol. 25, 5, 477, 1897.

estesamente, che lo sviluppo è proporzionato allo scambio gassoso.

Non resta perciò altra ipotesi che essi abbiano la facoltà, mancando l'ossigeno libero di ritrarlo dalle sostanze componenti il substrato.

Il BEIJERINCK infatti constatò che gli anaerobi hanno bisogno di sostanze facilmente riducibili appunto perchè tolgono l'ossigeno dai substrati, donde spiegasi lo scopo del loro energico potere fermentante.

HESSE constatò lo stesso fatto e vide che lo sviluppo degli anaerobi è favorito dagli acidi amidici, nactolici, monosolforici ecc. mentre è danneggiato dalle sostanze ossidanti, come il cromato potassico, l'acido iodico ecc.

Sappiamo inoltre che dal ricambio materiale si può sviluppare ossigeno libero attivo, come ebbe a dimostrare WURSTER (1) usando come reattivo, la carta tetramethylparaphenylendiamina.

E, siccome abbiamo visto che in un mezzo affatto privo di ossigeno libero gli *anaerobi* si sviluppano meno bene, ne consegue che essi *per il loro sviluppo* abbiano sempre bisogno d'una certa quantità di ossigeno libero — *ossigeno iniziale* — che li metta in grado di potersi in seguito procurare questo gas da loro stessi, elaborandoselo dal substrato.

Abbiamo detto *per il loro sviluppo*, poichè essi avendo la proprietà, come altri batteri, di vivere in vita latente, possono naturalmente in questo stato fare a meno dell'ossigeno.

Anche BOMY potè conservare in vita latente per 4 o 5 anni parecchie culture di microrganismi tenute chiuse ermeticamente: Era quindi una vita latente.

L'ipotesi sopradetta avrebbe analogia col fatto che si verifica nelle cellule di tutti i tessuti dei vertebrati, che non vengono in contatto con l'ossigeno libero, ma sottraggono l'ossigeno per le loro ossidazioni chimiche alla ossiemo-

(1) WURSTER, Anwendung des tetramethylparaphenylendiamins für quantitativen Schätzung. aktiven Sauerstoffs.

globina e rientrerebbe pur essa incondizionatamente nella legge di fisiologia generale dedotta dal VERWORN (1) nella interpretazione dei fatti osservati dall'HERMANN (2) sull'irritabilità conservata del muscolo gastrocnemo di rana messo in un cilindro con puro idrogeno. L'HERMANN avea utilizzato questo fatto per mostrare che se il muscolo privato d'ossigeno presenta ancora contrazioni, deve lavorare a spese dei processi di dissociazione, poichè tagliando a pezzi detto muscolo e disanguandolo, non poteva essere estratto più con la pompa ossigeno.

Il VERWORN trovò questa spiegazione ingiusta ed improbabile, perchè dal fatto *che dal muscolo non si possa più estrarre ossigeno libero*, non si deve dedurre che non vi sia più nel muscolo dell'ossigeno utilizzabile per i processi di ossidazione; ed egli dice più probabile che nel muscolo e specialmente nel sarcoplasma dei fasci fibrillari esista dell'ossigeno combinato, consumato continuamente dalle particelle contrattili per la loro ossidazione.

Da questa ipotesi il VERWORN deduce che nelle cellule che vivono per un certo tempo senza ossigeno, avvengono ancora processi di ossidazione, poichè certi complessi di atomi della sostanza viva che contengono ossigeno lo sottraggono per la propria ossidazione ad altri complessi in cui l'ossigeno è combinato più tenuemente, finchè il medesimo è infine tutto consumato e combinato ai prodotti di dissociazione, ma comunque ciò sia, conchiude il VERWORN, *mancando l'ossigeno dopo un tempo più o meno lungo tutti gli organismi vivi periscono; dunque senza ossigeno non può esistere la vita.*

Questa legge dalla quale il citato autore escludeva gli *anaerobi* è per noi legge *generale* di fisiologia ed anche questi rientrano in essa.

Non sussiste quindi questa eccezione a quella geniale ipotesi del MAYER sulla respirazione dell'ossigeno libero e

(1) MAX VERWORN, *Fisiologia generale. Saggio sulla teoria della vita.*

(2) HERMANN, *Untersuchungen zur Physiologie der Muskeln und Nerven.* 1, III, Berlin 1868.

se i processi d'ossidazione nella serie dei processi di ricambio materiale, formano un processo integrante è chiaro che la presenza dell'ossigeno è necessaria alla vita e l'anaerobiosi non è che un'eccezione apparente alla legge di natura.

Gli anaerobi sono quindi per noi microrganismi la di cui vita è in relazione con un optimum di tensione minima di ossigeno e che hanno inoltre la proprietà di sottrarre per il loro sviluppo questo gas alle sostanze che si trovano a contatto loro.

Che questa proprietà sia in relazione con la presenza di un *enzima speciale* che presieda al disgregamento delle combinazioni più labili dell'ossigeno, potrà formare oggetto di ulteriori ricerche. Ad ogni modo detta proprietà ed il fatto che è possibile abituare gli anaerobi a crescere sotto una pressione di ossigeno anche dieci volte superiore a quella che essi sopportano normalmente (1) e che rappresenta il loro optimum ci fa pensare che simili passaggi ed adattamenti nella vita loro abbiano una grande importanza in natura.

(1) CHUDIAKOW, loc. cit.

